



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학박사학위논문

성숙도에 따른 오디의 이화학
특성과 *in vitro* 생리 활성

**Changes in Physicochemical Characteristics and
in vitro Biological Activity of Mulberry
during Ripening**

2017년 8월

서울대학교 대학원

식품영양학과

이 용 철

국문 초록

성숙도에 따른 오디의 이화학 특성과

in vitro 생리 활성

서울대학교 대학원 식품영양학과

이 용 철

오디는 뽕나뭇과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무 (*Morus alba* L.)의 열매로서 다양한 파이토케미컬을 함유하고 있어 생리 활성에 효과가 있다고 알려져 있다. 하지만 오디는 과육이 연해서 유통과 저장에 어려움이 있다는 단점이 있으므로 활용도를 높일 수 있는 연구가 필요하다. 예로부터 완전히 익기 전 자홍색의 오디는 상심(桑椹)이라 하여 소갈, 자양 강장, 빈혈, 관절염에 효과가 있는 한약재로 쓰여 왔으나, 성숙 과정에 따른 오디의 이화학 특성과 생리 활성에 대한 체계적인 연구는 미미하다.

본 연구에서는 성숙도에 따른 오디의 이화학 특성과 *in vitro*에서의 생리 활성 변화를 분석하여 오디의 성숙 정도에 따른 활용 가능성을 검토하였다. 꽃이 핀 뒤에 첫 열매를 맺은 4주 이후 약 3주간 열매의 색깔 변화로부터 숙성 1-6기(maturity stage(MS)-1-6), 그리고 열매가 완전히 익은 상태를 숙성 7기(MS-7)로 구분하였다. 시료는 채취 즉시 액체 질소로 냉동하여 영하 20도의 냉동고에

보관하면서 실험에 사용하였다. 오디의 일반 성상(무게, 색깔, 정도, 크기, 무게 등)은 오디 자체를, pH, 산도와 고형물은 즙으로, 그 밖의 특성은 냉동 건조한 가루를 시료로 하여 분석하였다. 이화학 특성으로는 일반성분, pH, 산도, ascorbic acid, 당, 무기질, 아미노산, 지방산, γ -aminobutyric acid (GABA)를 분석하였고, 이와 관련하여 생리 활성에 기여하는 페놀 화합물을 HPLC-ESI-MS로 탐색하였다. 그 밖의 생리 활성 분석으로는 산화방지능, Raw264.7 세포에서 산화질소(II) 생성 억제 능력, HepG2 세포에서 hexokinase 활성과 α -glucosidase 억제 능력을 분석하였다.

오디 과피의 색도는 오디가 익어감에 따라 명도와 황색도가 감소하였고 크기와 무게는 증가하였으며, 정도는 12.7에서 1.1 kgf으로 급격히 감소하였다. 오디의 고형물 함량은 5.6-13.7브릭스였고 pH는 3.5-5.5로 익는 과정 동안 증가하는 경향인 반면, 산도는 2.4에서 0.3 g/100 mL로 감소하였다. 조회분, 조단백질, 조섬유는 익어가는 동안 감소하였다. 조지방은 성숙 중반(MS-3)까지 증가하다가, 익어가면서 다시 감소하였다. 유리당 함량은 익는 과정 동안 증가하였고, 특히 완숙 시기(MS-6, 7)의 유리당 함량은 미숙 시기(MS-1, 2)보다 10배 가까이 높았다. Ascorbic acid 함량은 11.3-44.5 mg/100 g (db)의 범위였다. 총 무기질 함량은 3.1-1.5 g/100 g으로 오디가 익을수록 감소하였다. 미숙 오디(MS-1, 2; 113.2, 59.6 mg/ 100 g)의 GABA 함량이 완숙 오디(MS-3-6, 17.1-33.6 mg/100 g)보다 높았다. 오디가 익어감에 따라 총 아미노산은 15.9에서 5.2 g/100 g으로 감소하였다. MS-6과 7의

proanthocyanidin 함량은 MS-1-5에 비해 낮았다. 총 polyphenol과 총 anthocyanin은 완숙기에 급격히 증가하였다. HPLC를 이용하여 개별 페놀 화합물을 분석한 결과, 오디가 익어감에 따라, phenolic acid와 rutin은 감소하는 경향이었고, anthocyanin은 증가하였다. Chlorogenic acid 함량은 3.92에서 0.58 mg/100 g (db)로 감소하였다. 오디의 DPPH와 ABTS 자유라디칼 제거활성은 익어감에 따라 증가하였고, 특히 마지막 완숙기(MS-6, 7)에 급격히 증가하였다.

미숙 오디(MS-1-5)의 총 cyanide 함량은 4.1-7.7 mg/100 g (db)이었고, 완숙 오디(MS-6, 7)에서는 검출되지 않았다. 오디의 주요 지방산은 80%가 linoleic acid였고, 익는 과정 동안 지방산 조성에는 큰 차이가 없었다. δ -토코페롤 함량은 미숙 오디(MS-1-5; 105.4-126.6 mg/100 g lipid)보다 완숙 오디(MS-6, 7; 93.5-96.9 mg/100 g)가 낮았다. 성숙도에 따른 오디의 총 추출물(MTE), nonanthocyanin 분획물(MNAF), anthocyanin 분획물(MAF)은 모두 Raw264.7과 HepG2 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았다. 그리고 MTE, MNAF, MAF는 Raw264.7 세포에서 산화질소(II) 생성을 억제시켜 염증 억제 효과가 있었다. Hexokinase 활성은 대조군에 비해 MS-5의 MNAF가 유의적으로($P<0.05$) 높았고, 완숙 오디(MS-6, 7)보다 미숙 오디(MS-1-5)가 높았으며, MAF는 모든 시료에서 다소 낮은 활성을 보였다. 오디가 익어갈수록 MNAF의 α -glucosidase 억제능은 낮아졌고, MAF의 경우는 높아졌다. 특히, 완숙 오디(MS-6, 7)의 MNAF와 미숙 오디(MS-

4, 5)의 MAF를 제외한 나머지 분획물이 acarbose보다 유의적으로 ($P<0.05$) 우수한 α -glucosidase 억제능을 보였다. 미숙 오디 총 추출물의 1-deoxynojirimycin 함량은 완숙 오디의 경우보다 높았다. LC-MS/MS 분석으로 페놀 화합물을 확인하고 정량한 결과, MTE와 MNAF에 함유된 phenolic acid는 chlorogenic acid가 대부분이었고 neochlorogenic acid와 cryptochlorogenic acid도 검출되었으며, 오디가 익어갈수록 급격히 낮아졌다. 오디가 익어감에 따라 caffeic acid는 감소하였고 protocatechuic acid와 ferulic acid는 다소 증가하는 경향이였다. 오디에 주로 함유된 flavonol은 rutin과 isoquercetin으로, 익어갈수록 감소하였으며, taxifolin은 증가하는 경향이였고, scopoletin은 감소하였다.

결론적으로 오디의 이화학 특성은 오디가 익는 과정 중 완숙기에 극적으로 변화하였다. 완숙 오디는 미숙 오디에 비해 총 polyphenol과 anthocyanin이 많아 산화방지 활성이 높았다. 미숙 오디는 저장성 측면에서 pH 낮고 산도가 높았고, 영양적 측면에서는 조단백질, 조지방, 조섬유, 무기질이 많았으며, 기능성 측면에서는 GABA, 아미노산, 토코페롤, phenolic acid, flavonol 함량이 높았다. 오디 총 추출물, MNAF, MAF는 산화질소(II) 생성을 억제시켰고, 특히 MNAF는 hexokinase 활성을 증가시키고 α -glucosidase를 억제하였다. 오디 추출물의 MNAF에 함유된 주요 페놀 화합물인 chlorogenic acid, rutin, isoquercetin, morin이 생리활성에 기여했다고 본다.

주요어: maturity, phenol compound, antioxidant activity, α -
glucosidase, nonanthocyanin, mulberry

학번: 2011-30476

목 차

국문 초록	i
목 차	vi
그림 목차	x
표 목차	xii
약어 일람	xv
제 1 장 서 론	1
1. 1 서론	2
1. 2 문헌 고찰	6
제 2 장 성숙도에 따른 오디의 이화학 특성	15
2. 1 서론	16
2. 2 실험재료와 방법	17
2. 2. 1 실험재료	18
2. 2. 2 색도 측정	20
2. 2. 3 크기와 무게 측정	20
2. 2. 4 경도 측정	20
2. 2. 5 일반성분 분석	20
2. 2. 6 산도, pH, 가용성 고형물 함량 측정	21
2. 2. 7 Ascorbic acid 분석	21
2. 2. 8 유리당 분석	22
2. 2. 9 무기질 분석	23
2. 2. 10 γ -Aminobutyric acid와 아미노산 분석	23
2. 2. 11 페놀 화합물과 산화방지 활성 분석을 위한 추출물	

제조	24
2. 2. 12 Proanthocyanidin 함량	25
2. 2. 13 총 polyphenol 함량	25
2. 2. 14 총 flavonoid 함량	26
2. 2. 15 총 anthocyanin 함량	26
2. 2. 16 페놀 화합물의 HPLC 분석	27
2. 2. 17 DPPH 자유라디칼 제거활성 측정	29
2. 2. 18 ABTS 자유라디칼 제거활성 측정	29
2. 2. 19 통계 분석	30
2. 3 결과와 고찰	30
2. 3. 1 색도	30
2. 3. 2 크기, 무게, 경도	32
2. 3. 3 일반성분	34
2. 3. 4 산도, pH, ascorbic acid, 고형물, 유리당 함량	36
2. 3. 5 무기질 함량	38
2. 3. 6 아미노산과 γ -aminobutyric acid 함량	40
2. 3. 7 Proanthocyanidin 함량	42
2. 3. 8 총 polyphenol, anthocyanin, flavonoid 함량	44
2. 3. 9 페놀 화합물의 HPLC 분석 결과	46
2. 3. 10 산화방지 활성	48
2. 4 결론	51
제 3 장 성숙도에 따른 오디추출물의 <i>in vitro</i> 생리 활성과	
기능 성분 분석	52
3. 1 서론	53

3. 2 실험재료와 방법	56
3. 2. 1 실험재료	56
3. 2. 2 총 cyanide 분석	56
3. 2. 3 시료 전처리	57
3. 2. 4 지방산 조성	59
3. 2. 5 토코페롤 분석	60
3. 2. 6 세포 배양	61
3. 2. 7 세포 독성	61
3. 2. 8 산화질소(II) 분석	62
3. 2. 9 Hexokinase 활성 분석	62
3. 2. 10 α -Glucosidase 활성 억제 측정	63
3. 2. 11 1-Deoxynojirimycin 정량	64
3. 2. 12 오디 추출물의 HPLC-MS/MS 분석	65
3. 2. 13 통계 분석	69
3. 3 결과와 고찰	70
3. 3. 1 총 cyanide 함량	70
3. 3. 2 지방산 조성	72
3. 3. 3 토코페롤 함량	74
3. 3. 4 추출 수율	77
3. 3. 5 세포 독성	77
3. 3. 6 산화질소(II)	81
3. 3. 7 Hexokinase 활성	83
3. 3. 8 α -Glucosidase 활성 저해	85
3. 3. 9 1-Deoxynojirimycin	88

3. 3. 10 오디 추출물의 HPLC-MS/MS 분석.....	90
3. 4 결론.....	103
제 4 장 요약과 결론.....	105
4. 1 요약.....	106
4. 2 결론.....	111
참고문헌	112
Abstract	127

그림 목차

Figure 1. Possible mechanism of action of chlorogenic acid on regulating glucose and lipid metabolism.....	14
Figure 2. Image of mulberry at different maturity stages.....	19
Figure 3. Changes in total polyphenols, anthocyanins, and flavonoids of mulberry during ripening.	45
Figure 4. Changes in DPPH and ABTS free radical scavenging activities of mulberry during ripening.	50
Figure 5. HPLC chromatograms of tocopherol standards and the lipid of mulberry (maturity stage-3) at 295 nm.....	75
Figure 6. Effect of mulberry total extract, nonanthocyanin and anthocyanin fractions on cell viability of Raw264.7 cell.....	79
Figure 7. Effect of mulberry total extract, nonanthocyanin and anthocyanin fractions on cell viability of HepG2 cell.....	80
Figure 8. Nitric oxide production of Raw264.7 cell treated with mulberry total extract, nonanthocyanin and anthocyanin fractions	82
Figure 9. Effect of mulberry nonanthocyanin and anthocyanin fractions on hexokinase activity of HepG2 cell.....	84

Figure 10. Effect of mulberry total extract, nonanthocyanin and anthocyanin fractions on α -glucosidase activity	86
Figure 11. Extracted ion chromatograms and MRM transition of 1-deoxynojirimycin and mulberry total extract (maturity stage-3).....	89
Figure 12. Total ion chromatograms of phenolic acid standards and mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage-3)	92
Figure 13. HPLC-DAD-MS analysis of chlorogenic acids and quercetins in mulberry total extract (maturity stage-3).....	94
Figure 14. Total ion chromatograms of flavonols and scopoletin standards, and mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage-3)	98
Figure 15. HPLC-DAD-MS analysis of morin in mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage-3).....	99

표 목차

Table 1. Operating conditions of HPLC–PDA for analysis of phenolic compounds	28
Table 2. Changes in Hunter’s color values of mulberry during ripening	31
Table 3. Changes in size, weight, and firmness of mulberry during ripening.....	33
Table 4. Changes in proximate composition of mulberry during ripening	35
Table 5. Changes in pH, acidity, soluble solid, ascorbic acid, and free sugars of mulberry during ripening	37
Table 6. Changes in mineral content of mulberry during ripening	39
Table 7. Changes in amino acids and γ –aminobutyric acid of mulberry during ripening	41
Table 8. Changes in proanthocyanidin of mulberry during ripening	43
Table 9. Changes in phenolic compounds of mulberry during	

ripening	47
Table 10. MRM conditions of HPLC–MS/MS for analysis of phenolic compounds	66
Table 11. MRM conditions of HPLC–MS/MS for analysis of phenolic compounds(continued)	67
Table 12. Operating conditions of HPLC–DAD–MS for phenolic compounds	68
Table 13. Changes in total cyanide of mulberry during ripening	71
Table 14. Changes in fatty acid composition of mulberry during ripening	73
Table 15. Changes in tocopherols of mulberry during ripening	76
Table 16. Changes in yield of mulberry extract during ripening	78
Table 17. Changes in 1–deoxynojirimycin of mulberry during ripening	90
Table 18. Changes in LC–MS/MS data of phenolic acids in mulberry total extract during ripening	95
Table 19. Changes in LC–MS/MS data of phenolic acids in	

mulberry nonanthocyanin fraction during ripening.....	96
Table 20. Changes in LC–MS/MS data of flavonols and scopoletin in mulberry total extract during ripening.....	101
Table 21. Changes in LC–MS/MS data of flavonols and scopoletin in mulberry nonanthocyanin fraction during ripening	102

약어 일람

HPLC	high performance liquid chromatography
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid
wb	wet basis
db	dry basis

제 1 장 서 론

1. 1. 서론

오디는 뽕나뭇과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무 (*Morus alba* L.)의 열매이다. 뽕나무는 전 세계의 온대와 아열대 지역에 널리 분포하고 있다(Machii 등, 2000). 과거 양잠 산업에 밀려 오디의 이용은 극히 제한적이었으나, 최근 천연 기능성 신소재 식품으로서 그 가치가 재조명되어 생산량이 증가 추세에 있다(MAFRA, 2016). 일반적으로 오디는 생으로 먹거나 주스 또는 와인과 같은 주류로 이용하고 있으며 예로부터 덜 익은 오디나 완전히 익은 오디를 자양 강장, 당뇨 억제, 면역 증강에 효과가 있는 전통 의약품으로 사용하여 왔다(Tang 등, 2011; Kim 등, 2013; KFDA, 2012).

일반적으로 오디에는 아미노산, 무기질, 유기산, 당 등을 비롯하여 polyphenol을 포함한 anthocyanin 색소를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라, 1-deoxynojirimycin, quercetin 글루코사이드, γ -aminobutyric acid (GABA), 알칼로이드, resveratrol 등의 생리 활성 물질을 함유하고 있어 당뇨 억제, 혈당 강하, 산화 방지, 항암, 고지방 혈증 억제, macrophage 세포 활성 증가, 신경세포 보호작용 등의 생리 효과가 있다고 알려져 있다(Lee 등, 2004; Kim 등, 2004; Ercisli와 Orhan, 2007; Pawlowska 등, 2008; Song 등, 2009, Kim 등, 2010; Kim 등 2013; Kong 등, 2008). 이러한 오디의 생리 효과에는 특히 anthocyanin을 포함한 여러 페놀 화합물

이 관여한다고 보고되고 있다(Bae와 Suh, 2007; Zhang 등, 2008; Wang 등, 2013).

오디는 과육이 연하고 과즙이 쉽게 손실되어 유통과 저장에 어려움이 있다는 단점이 있다. 완숙 오디는 이런 단점 때문에 곰팡이의 증식이 용이해지고, 품질이 떨어진다고(Park 등, 2013). 그러므로 오디의 이용 가치를 증대시키기 위해서는 익는 과정 동안의 오디의 이화학 성분과 기능 성분의 변화에 대한 총체적인 연구가 필요하다.

최근에는 만성 질환에 대한 관심이 높아지면서, 질병의 치료와 예방에 효과가 있는 기능성 식품 연구가 활발해지고 있다. 만성 질환의 하나인 당뇨병은 포도당 항상성에 문제를 일으키는 질병으로 많은 합병증을 유발한다. 최근에는 당뇨병 치료를 식후 혈당 지수의 개선에 초점에 맞춰 수행하는 추세이다(American Diabetes Association, 2001; Bastyr 등, 2000). 현재 식후 탄수화물의 소화 흡수를 지연시킴으로써 갑작스런 혈당 상승을 방지하는 경구용 혈당 강하제인 아카보스(acarbose)는 α -glucosidase 효소 활성 부위에 경쟁적으로 결합하여 비가역적으로 활성을 억제시키는 작용을 한다(Reaven 등, 1990). 그러나 아카보스 혹은 메트포민(metformin)과 같은 계통의 경구용 혈당 강하제는 탄수화물의 소화 불량을 일으켜 복부 팽만, 구토 등의 부작용을 일으키므로, 부작용의 가능성이 적은 자연물로부터 얻을 수 있는 방법들을 모색하고 있는 추세이다(Park, 2007). 특히 식물 유래 페놀 화합물이 α -glucosidase와 α -amylase 등의 소화 효소에 효과가 있다는 보고들이 증가하고 있다. McDoughall 등(2008)과 Podsedek 등

(2014)은 베리에 많이 함유되어 있는 phenolic acid, flavonol, anthocyanin, ellagitannin, proanthocyanidin 등의 polyphenol이 α -glucosidase, α -amylase, 췌장 lipase의 효소 활성을 억제한다고 하였고, Benalla 등(2010)은 블루베리에 풍부한 anthocyanin이 효과적인 α -glucosidase 억제제라고 보고하였다. Wang 등(2013)은 오디 추출물의 당뇨 억제와 산화 방지 효과를 보고하였는데, 오디 추출물(에탄올, 헥세인, 다이클로로메테인, 아세트산에틸, 뷰탄올, 물 분획물) 중 아세트산에틸 분획물이 아카보스와 같은 α -glucosidase 50% 저해능을 보였고, 동물실험(쥐)에서도 그 효과가 나타났다고 밝혔다. 또한, 오디 추출물이 Raw264.7 macrophage 세포에서 염증 억제 효과를 나타냈으며, 장 조직에서 염증 및 종양 억제 효과가 있었다(Quian 등, 2015).

지금까지 살펴보았듯이, 오디에 함유된 여러 파이토케미컬(phytochemicals)이 생리 활성에 효과가 있으며, 특히 anthocyanin과 phenolic acid 및 quercetin 등과 같은 nonanthocyanin 분획물이 많이 기여하는 것으로 나타났다. 하지만, 생리 활성 효과와 기능 성분에 대한 보고는 대부분 완숙 오디를 조사한 연구였으며, 미숙 오디에 관한 연구는 미미하다. 유통과 저장에 취약한 오디의 단점을 극복하고, 부가가치를 증대시키기 위해서는 보다 총체적이며 다각적인 검토가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 오디의 성숙 과정을 7단계로 세분하여 색도, 경도, 일반성분, 유리당, 무기질, 아미노산, 페놀 화합물 등의 이화학 특성과 산화방지 활성을 조사하고, 성숙도에 따른 오디 에탄올 추출물,

nonanthocyanin, anthocyanin 분획물의 생리 활성과 기능 성분의
구체적인 분석을 수행하여, 기능성 식품 소재로서 완숙 오디뿐만 아
니라 미숙 오디의 잠재적 활용 가능성을 탐색하였다.

1. 2. 문헌 고찰

1. 2. 1. 오디

뽕나뭇과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매인 오디는 예로부터 한약재로 상심이라 한다. 동의보감에는 ‘상심의 성질은 차고 맛은 달며 독은 없다. 소갈증을 치료하고 삼장의 기능을 좋게 하며, 오래 먹으면 배가 고프지 않게 된다. 검은 오디는 뽕나무의 정기가 다 들어있다’라고 기술되어 있다(허준, 2005). 자홍색의 상심은 소갈, 자양강장, 빈혈, 관절염에 효과가 있다고 알려져 있다. 대한약전 외 한약(생약) 규격집에서는 ‘상심(桑椹), 상심자는 뽕나무 또는 그 밖의 같은 속 근연 식물(뽕나뭇과)의 완전히 익기 전의 열매이다’라고 하였다(식품의약품안전처, 2015). 한약재 감별도감에 따르면, ‘상심자는 뽕나무의 열매를 4-6월에 씨가 붉게 변했을 때 수확하여 그대로 햇볕에 말리거나 일부 찌서 햇볕에 말린 것으로, 타원형의 형태로 지름 0.5-0.8 cm, 길이 1-2 cm의 황갈색, 적갈색 또는 어두운 자주색을 띠고 있으며, 맛은 조금 시고 달다’라고 하였다(식품의약품안전처, 2009).

오디는 과거 양잠 산업에서 누에 사육을 위한 뽕잎의 수확 시기와 맞물려 남은 뽕나무의 부산물로서 일부 잼, 침출주, 시럽 등으로 소량으로 활용되어 왔을 뿐 그 이용이 극히 제한적이었다. 더욱이 과육이 연하고 과즙이 쉽게 손실되어 유통과 저장에 어려움이 있다는 오디의 단점이 낮은 이용률에 영향을 주었다(Kim 등, 2003). 그

러나 2007년부터 오디 생산에 대한 통계가 작성된 이후 오디 생산용 뽕나무 재배면적, 생산량, 생산액이 지속적으로 증가하고 있다(MAFRA, 2016). 이와 같이 오디의 생산량 증가와 함께 식품업계에도 오디를 소재로 한 가공식품에 관심이 높아지면서 오디의 가공에 대한 연구가 활발해지고 있으며, 주로 오디를 이용한 잼, 와인, 식초, 드레싱 같은 가공 식품 개발이 진행되고 있다(Park 등, 2013).

오디의 파이토케미컬로는 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, chlorogenic acid, quercetin 유도체, morin, resveratrol, stilbenoid, 1-deoxynojirimycin 등이 있어서 생리 효과를 나타낸다고 알려져 있다(Lee 등, 2004; Kim 등, 2004; Ercisli와 Orhan, 2007; Pawlowska 등, 2008; Song 등, 2009, Kim 등, 2010; Kim 등 2013; Kong 등, 2008). 이러한 기능성 소재로서 오디의 생리 효과가 부각되면서 생과의 유통이 활발해졌으나, 생과는 과육이 연하고 수확 시 손상이 발생하기 용이하므로 유통과 저장에 어려움이 있어 상품성이 저하되기 쉽다(Park 등, 2013). 또한 오디는 다른 베리에 비해 pH가 높고 산도가 낮는데, 낮은 pH와 높은 농도의 산도는 과일의 저장에 매우 중요하다(Viljakainen 등, 2002). 국내에서 재배되는 오디, 블랙라즈베리, 라즈베리, 블루베리의 pH와 산도를 분석한 결과, 오디의 pH는 5.2로 나머지 3종 베리의 pH(3.3-3.7)보다 높았고, 산도는 0.3%(w/v)로 나머지 3종 베리의 산도(0.6-1.1%)보다 낮았다(Lee 등, 2015). 이와 유사한 결과로 오디의 pH가 5.6, 산도가 0.3%(Ercisli와

Orhan, 2007), 3개 품종 오디의 pH가 5.4–5.5(Lee 등, 1998), 블랙라즈베리와 품종별 라즈베리의 pH가 3.2–4.0(Oh 등, 2008), 재배종 및 야생종 라즈베리의 총산도가 1.4–2.5%(Lee 등, 2014)라는 연구들이 보고되었다. 이러한 결과는 오디가 다른 베리에 비하여 pH가 높고 산도가 낮아 저장성이 취약하다고 볼 수 있다. 이에 오디의 신선도 연장과 유통기술 개발이 필요하지만 아직까지 미흡한 실정이다(Hong 등, 2012; Park 등, 2013).

1. 2. 2. 페놀 화합물

페놀 화합물은 하나 혹은 여러 개의 방향족 고리 구조에 한 개 이상의 수산기를 가진 화합물을 말하며, 크게 flavonoid와 nonflavonoid 화합물로 분류될 수 있다. 식품에 있어 주요한 nonflavonoid 페놀 화합물로는 C₆–C₁ 구조의 phenolic acid, C₆–C₃ 구조의 hydroxycinnamate와 이것의 축합 유도체, 그리고 polyphenolic C₆–C₂–C₆ 구조의 stilbene이 있다. 가장 일반적인 hydroxycinnamate에는 *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid 외에 이들의 tartrate ester와 coumaric acid, caftaric acid, fertaric acid가 있다. Caffeic acid의 quinic acid 축합물인 caffeoylquinic acid는 chlorogenic acid라고 하며, 과일과 채소에 보편적으로 함유되어 있다(Cesar, 2009).

Flavonoid는 15개의 탄소가 탄소사슬 3개와 2개의 방향족 고리로 이루어진 polyphenolic 화합물로서 중앙에 있는 3개의 탄소구조

에 따라 flavonol, flavone, flavan-3-ol, anthocyanidin 등으로 분류한다. 이 중 flavonol은 식품으로 섭취하는 식물체에 가장 널리 분포하는 flavonoid이고, 대부분 당과 결합한 형태로 식물 조직 내에 존재하며(Mullen 등, 2004), 과일과 채소에는 quercetin이 광범위하게 함유되어 있다(Marks 등, 2008). Anthocyanin은 과일과 꽃의 조직에 존재하는 수용성 색소로서 aglycone인 anthocyanidin의 3번과 5번 위치에 있는 수산기의 하나 또는 그 양쪽에 당이 결합된 구조를 갖는 flavonoid이다(Prior와 Wu, 2006). 과일에 가장 보편적으로 함유되어 있는 anthocyanin은 cyanidin-3-glucoside이다(Kong 등, 2003). 식물체내에서 anthocyanin은 과도한 광분해로부터 엽록체를 보호하고, 자유라디칼과 활성산소를 제거하며, 수분과 정에서 곤충을 유혹하는 역할을 한다(Gould, 2004).

식물체는 2차 대사산물인 페놀 화합물을 지속적으로 생산하고 축적한다(Crozier 등, 2006). 페놀 화합물은 식물체내에서 식물 조직의 구조를 이루거나 주변 환경과의 상호작용을 위한 신호물질로써 작용할 뿐만 아니라 곤충과 병원체로부터의 보호, 자외선에 의한 손상 보호, 산화방지 등의 다양한 기능을 한다(Cesar, 2009). 이러한 기능을 하는 페놀 화합물은 식물을 식품으로 섭취하는 인간의 건강에도 긍정적인 생리 효과를 나타낸다.

1. 2. 3. 항산화와 당뇨병

인체는 호흡을 통해 산소 분자를 세포 내로 유입하여 에너지를

만들고 이 과정에서 활성산소를 생성한다. 체내의 항산화 효소와 비효소적 항산화 화합물은 활성산소를 제거하고 정상적인 세포 기능을 유지하도록 한다. 하지만 체내 항산화 시스템의 불균형으로 인해 활성산소가 비정상적으로 증가하면 세포는 산화적 스트레스를 받고, 이는 생체 조직에서 노화, 암, 염증, 동맥경화, 당뇨병 등의 질병이 유발되는 원인이 된다.

만성 질환의 하나인 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성 증가와 인슐린 분비 감소로 인해 간, 지방, 근육조직 등의 인슐린 표적세포에서 지방 분해와 당 대사 감소현상이 나타나고, 결국 혈당의 조절 능력이 상실되어 여러 합병증을 유발한다(Weyer, 1999). 당뇨병은 체내에서 당질 대사 이상을 초래할 뿐만 아니라 당뇨병성 산화적 스트레스를 증가시켜 심혈관과 미세혈관막에 당뇨병성 망막증, 허혈성 심혈관, 동맥경화 등의 합병증을 동반한다(Haffner 등, 1997). 당뇨병이 진행되면 체내 산화방지 효소 활성이 감소되고 혈장과 조직 내의 산화적 스트레스 증가를 수반하여 지질 과산화물이 증가하는데, 이러한 질환의 증상 완화에 천연 산화방지제인 페놀 화합물이 지질 대사와 산화방지 시스템의 개선과 더불어 당질 대사를 개선한다는 보고가 있다(Kao 등, 2006; Ong 등, 2013; Sun 등, 2014; Scalbert 등, 2005). 혈액의 포도당 농도가 일정 수준 이상이 되면 인슐린에 의해 지방세포, 근육세포, 간세포의 세포막으로 당 수용체인 GLUT4와 GLUT2를 이동시켜 세포 내로 당의 유입이 증가하게 된다(Matchinsky, 1968). Glucokinase는 hexokinase의 이성질체로서 간에서 포도당을 인산화하여 glycogen 생합성과 ATP 생성에

관여하고, 췌장 베타세포막의 GLUT2를 통해 유입된 포도당을 인지하여 인슐린 분비를 가능하게 한다(Iynedjian 등, 1986). 많은 수의 제2형 당뇨병 환자에게서 glucokinase의 활성이 낮아져 있다는 것이 알려져 있다(Caro 등, 1995).

1. 2. 4. 페놀 화합물의 생리 활성

전세계적으로 많은 인구가 만성 질환의 유병률 증가로 인해 삶과 건강뿐만 아니라 사회적, 경제적인 발전을 위협받고 있다. WHO에서는 식사 습관을 비롯한 생활 방식을 변화시킴으로써 만성 질환 중 심혈관 질환의 80%, 제2형 당뇨병의 90%, 암의 30%를 예방할 수 있으며, 과일과 채소를 불충분하게 섭취하면 고콜레스테롤 혈증, 고혈압, 비만을 유발한다고 보고하였다(WHO, 2003). 기존에 보고된 역학 연구들에 의하면, 페놀 화합물이 풍부한 과일 및 채소를 충분히 섭취하면 만성 질환을 예방하는 효과를 나타냈다(Law와 Moriss, 1998; Riboli와 Norat, 2003; Steinmetz와 Potter, 1996). 현재 polyphenol이 심혈관이나 암, 당뇨병 같은 질환에 대하여 우수한 예방 효과가 있을 것으로 알려지면서, polyphenol의 다양한 생리 활성에 관한 연구가 진행되고 있는 추세이다(Scalbert 등, 2005). 활성산소로 인한 산화적 스트레스가 죽상동맥경화증과 신경퇴행성 질환을 유발하는 원인 중 하나로 밝혀졌는데, 천연 산화방지제인 flavonoid를 포함한 페놀 화합물이 자유라디칼을 직접 제거함으로써 이러한 만성 질환을 예방하는데 효과가 있다고 알려져 있다

(Heim 등, 2002).

최근에는 당뇨병 치료를 식후 혈당 지수의 개선에 초점에 맞춰 수행하는 추세이다(American Diabetes Association, 2001; Bastyr 등, 2000). 식후 탄수화물의 소화 흡수를 지연시킴으로써 갑작스런 혈당 상승을 방지하는 아카보스 혹은 메트포민과 같은 계통의 경구용 혈당 강하제는 탄수화물의 소화불량을 일으켜 복부 팽만, 구토 등의 부작용을 일으키므로, 부작용의 가능성이 적은 자연물로부터 얻을 수 있는 방법들을 모색하고 있는 추세이다(Park, 2007). 특히 식물 유래 페놀 화합물이 α -glucosidase와 α -amylase 등의 소화 효소에 효과가 있다는 보고들이 증가하고 있는데, 코코아(Gu 등, 2011), 유색 곡물(Yao 등, 2010), 차의 polyphenol 분획물(Wongsa 등, 2012)이 이러한 소화 효소를 억제한다는 연구가 있다. McDoughall 등(2008)과 Podsedek 등(2014)은 베리에 많이 함유되어 있는 phenolic acid, flavonol, anthocyanin, ellagitannin, proanthocyanidin 등의 polyphenol이 α -glucosidase, α -amylase, 췌장 lipase의 효소 활성을 억제한다고 하였고, Benalla 등(2010)은 블루베리에 풍부한 anthocyanin이 효과적인 α -glucosidase 억제제라고 보고하였다. 더욱이, Son과 Choi(2013)는 4가지 베리류 과일(오디, 블루베리, 딸기, 복분자) 와인 중 오디 와인이 α -glucosidase 억제능이 가장 높았으며, quercetin과 그 유도체가 가장 크게 기여한다고 보고하였다.

Chlorogenic acid는 식물 유래 2차 대사산물인 phenolic acid 중 하나로, 산화방지, 지방질 이상 개선, 혈당 저하 등의 생리 효과를

나타낸다고 알려져 있다(Santos 등, 2006; Ong 등, 2013). 특히 chlorogenic acid는 포도당과 지방질 대사에 관여하며, AMPK를 활성화시켜 GLUT4가 세포막 사이에서 원형질 막으로의 이동을 야기하여 당 수송 능력을 증가시키는 thiazolidinedione계 경구용 혈당 치료제와 같은 역할을 보이고(Kruth-Kraczek 등, 1999), 간에서 당 생성과 지방질 생성을 억제하는 효과가 보고되었다(Figure 1)(Meng 등, 2013).

아밀로이드(amyloid)는 당단백질의 일종으로 뇌, 신장, 췌장 등에 형성되어 만성 질환인 알츠하이머, 파킨슨, 제 2형 당뇨병 등을 유발한다. 특히, 제 2형 당뇨병에서 아밀로이드의 축적은 췌장 베타 세포(beta cell)의 사멸을 초래하여 증상을 악화시키는데, islet amyloid polypeptide (IAPP)가 아밀로이드 형성에 관여한다(Clark 등, 1987). 이에 아밀로이드 섬유 형성 억제에 flavonoid가 효과를 나타내는 연구들이 활발히 이루어지고 있는데, 여러 flavonoid 중 morin hydrate가 IAPP에 영향을 주어 아밀로이드 형성과 아밀로이드 섬유의 분해에 우수한 효과가 있다고 보고되었다(Noor 등, 2011).

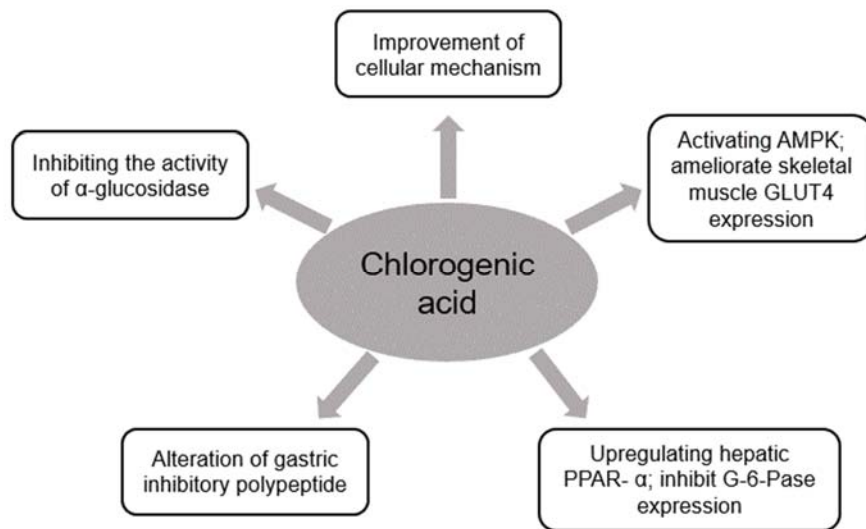


Figure 1. Possible mechanism of action of chlorogenic acid on regulating glucose and lipid metabolism (Meng et al., 2013).

제 2 장

성숙도에 따른 오디의 이화학 특성

2. 1. 서론

오디는 뽕나뭇과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무 (*Morus alba* L.)의 열매로, 전 세계의 온대와 아열대 지역에 널리 서식하고 있다(Machii 등, 2000). 일반적으로 오디는 생으로 먹거나 주스 또는 와인과 같은 주류로 이용하고 있으며 예로부터 덜 익은 오디나 완전히 익은 오디를 자양강장, 당뇨 억제, 면역 증강에 효과가 있는 전통 의약품으로 사용하여 왔다(Tang 등, 2011; Kim 등, 2013; KFDA, 2012).

일반적으로 오디에는 아미노산, 무기질, 유기산, 당 등을 비롯하여 polyphenol을 포함한 anthocyanin 색소를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라, 1-deoxynojirimycin, quercetin 유도체, GABA, 알칼로이드, resveratrol 등의 생리 활성 물질을 함유하고 있어 당뇨 억제, 혈당 강하, 산화 방지, 항암, 고지방 혈증 억제, macrophage 세포 활성 증가, 신경세포 보호작용 등의 생리 효과가 있다고 알려져 있다(Lee 등, 2004; Kim 등, 2004; Ercisli와 Orhan, 2007; Pawlowska 등, 2008; Song 등, 2009, Kim 등, 2010; Kim 등 2013; Kong 등, 2008). 이러한 오디의 생리 효과에는 특히 anthocyanin을 포함한 여러 페놀 화합물이 관여한다고 보고되고 있다(Bae와 Suh, 2007; Zhang 등, 2008; Wang 등, 2013).

오디는 과육이 연하고 과즙이 쉽게 손실되어 유통과 저장에 어려움이 있다는 단점이 있다. 완숙 오디는 이런 단점 때문에 곰팡이의 증식이 용이해지고 품질이 떨어진다고 보고되었다(Park 등, 2013). 그러므로 오

디의 이용가치를 증대시키기 위해서 익는 과정 동안의 오디의 이화학 성분 변화에 대한 연구가 필요하다. 오디가 아직 익지 않았거나 익는 과정 중 이화학 성분에 대한 연구가 일부 보고되었다. Lou 등(2012)은 오디 과피의 색 강도에 따라 총 polyphenol, flavonoid, 당, 산화방지 활성을 조사한 결과, 이들 성분은 성숙 정도에 상응하여 변화했다고 하였다. Oki 등(2006)은 4단계로 나눈 성숙도에 따른 오디의 anthocyanin, 총 polyphenol, DPPH 자유라디칼 제거활성을 분석하고, 주요 DPPH 산화방지 성분을 보고하였다. Lin과 Lay(2013)는 3단계로 나눈 성숙도에 따른 오디의 고형물, pH, 수분, flavonoid와 DPPH 자유라디칼 제거활성을 조사하였다. 이들 연구는 오디가 익어감에 따른 일부 이화학 성분 변화를 조사하였으나, 오디의 잠재적 이용 가치를 증대시키기 위해서는 익는 과정 중 변화하는 이화학 특성과 기능 성분에 대한 더 총체적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 유통과 저장에 취약한 오디의 단점을 극복하고, 부가가치를 증대시키기 위하여 오디의 성숙 과정을 7단계로 세분하여 색도, 경도, 일반성분, 당, 무기질, 아미노산, 페놀 화합물 등의 이화학 특성과 산화방지 활성을 조사하고 기능성 식품 소재로서 완숙 오디뿐만 아니라 미숙 오디의 잠재적 활용 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. 2. 실험재료와 방법

2. 2. 1. 실험재료

본 실험에 사용된 뽕나무(*Morus alba* L.) 재배 품종은 한울 2호로, 경기도 양평군 양평오디영농조합법인의 한 농장에서 2014년 5월말에서 6월 중순까지 약 2주 간 오디농장 전체에 있는 뽕나무의 각 시기별 평균적으로 익은 오디를 성숙도에 따라 손으로 직접 채집하였다. 익는 시기는 개화 후 약 4주 경과된 오디(MS-0)를 최초 과일로 간주하였고, 이후 3주간 7단계에 걸쳐 오디의 색과 크기를 고려하여, 뽕나무 중간 부위의 열매를 수확하였다(Figure 2). MS-1-5는 미숙 단계로 녹색에서 검붉은 색이었으며, MS-6, 7은 완숙 단계로 검은색이었다. 뽕나무 줄기에서 쉽게 떨어지는 시기의 오디를 MS-7로 하였으며, 겉으로는 MS-7과 차이가 없었으나 줄기에 단단히 매달려 있는 오디를 MS-6으로 정하였다. 채집 즉시 액체질소로 냉동하여 실험실로 이동 후 -22°C 에서 냉동 보관하였고, 일부 과일은 수분, 무게, 크기, 색도, 경도 분석에 사용하였다. 냉동한 과일은 수일 내 냉동 건조(Alpha 1-2 LD plus, CHRIST, Osterode, Germany) 후 분쇄(Artlon Gold Mixer, Daesung Artlon Co., Paju, Korea)하였고, -22°C 에서 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

2. 2. 2. 색도 측정

오디 과피의 색도는 Chroma meter (CR-400, Konica Minolta, Osaka, Japan)로 측정하였다. 성숙 시기별 오디를 10개 이상씩

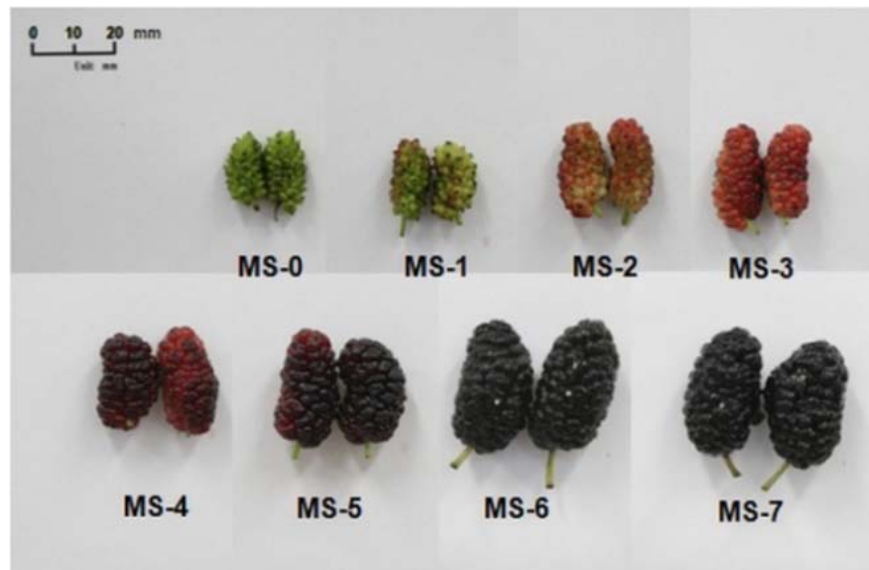


Figure 2. Image of mulberry at different maturity stages (MS). MS-0, four weeks elapsed after flowering; MS-0, 1, 2, 3, 4, and 5, immature phases; MS-6, mature phase; and MS-7, fully mature phase.

취하여 각 오디 중간 부위의 L(명도), a(적색도), b(황색도) 값을 측정한 후 각각의 평균값으로 나타내었다.

2. 2. 3. 크기와 무게 측정

성숙 시기별 오디를 10개씩 취하여 크기와 무게를 측정하였다. 크기는 vernier caliper를 이용하여 가로, 세로, 두께를 측정하였고, 무게는 디지털 저울(OHAUS Explorer, OHAUS Co., Parsippany-Troy Hills, NJ, USA)을 이용하여 10개씩 10회 측정하였다.

2. 2. 4. 경도 측정

크기와 모양이 비교적 일정한 각 성숙 시기별 오디를 10개 이상 취하여 텍스처분석기(TA XT plus, Stable Micro System, London, England)를 이용하여 경도를 측정하였다. 시료를 수평으로 놓고 직경 25 mm 원기둥 프로브로 시료 중간부위의 높이 60%까지 압축 시 나타난 피크의 최고 값으로 경도를 나타내었다.

2. 2. 5. 일반성분 분석

오디의 수분함량은 채집 즉시 약 50개의 생 과일을 취하여 두 단계 건조방법(AACC, 1995)으로 측정하였다. 조회분, 조단백질, 식이섬유 함량은 냉동 건조 분말 오디를 각각 AOAC 930.05, AOAC 2001.11, AOAC 2002.04 방법(AOAC, 2005)으로 분석하

였다. 조지방 함량은 분말 오디를 에틸에테르(Fisher Scientific Korea Ltd., Seoul, Korea)로 자동속시렛추출기(Büchi Extraction System B-811, Büchi, Flawil, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

2. 2. 6. 산도, pH, 가용성 고형물 측정

오디를 파쇄하여 착즙한 오디즙을 시료로 하여 산도, pH, 가용성 고형물 함량을 측정하였다. 산도와 pH는 디지털 pH meter (Orion 3 Star pH Portable, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하였고, 산도는 pH가 8.2가 되는데 소요되는 0.1 N 수산화 소듐(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)의 소비량을 구하여 산출하였다(AOAC 942.15, AOAC, 2005).

2. 2. 7. Ascorbic acid 분석

Ascorbic acid는 HPLC (Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 분말 오디 약 0.5 g에 10% (w/v) 메타인산(Wako Pure Chemical Industries) 2 mL로 적신 후 5% (w/v) 메타인산 10 mL를 넣어 잘 섞고 10분간 초음파 추출(ultrasonic bath; Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)하였다. 5분간 1,717×g로 원심분리(Combi-514R, Hanil Science Industrial Co., Incheon, Korea) 후 상층액을 회수하였고, 하층 잔여물은 다시 추출하여 상

층액을 모아 5% 메타인산으로 부피플라스크에 25 mL까지 채웠다. 이 추출액을 0.45 μm 나일론 필터(Chemco Scientific Co., Osaka, Japan)로 여과 후 HPLC로 다음과 같이 분석하였다. 컬럼은 Quicksorb column (Chemco Pak, 3 μm , 4.6 mm \times 150 mm, Chemco Scientific Co.)을 이용하여 아세트나이트릴(Merck Chemicals, Darmstadt, Germany)/0.05 M 인산포타슘(Wako Pure Chemical Industries)(30:70, v/v) 용매를 0.8 mL/min 속도로 10 분간 흘려주었고, 컬럼 오븐은 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며, 검출파장은 254 nm였다.

2. 2. 8. 유리당 분석

분말 오디 약 0.5 g을 50%(v/v) 에탄올(Fisher Scientific Korea Ltd.) 10 mL로 진탕 추출한 후 5분간 1,717 \times g에서 원심 분리하였다. 하층 잔여물에 위의 과정을 반복하여 상층액을 모아 부피플라스크에 25 mL까지 채운 후 0.45 μm 나일론 필터로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC는 Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies)에 ELSD 검출기(Agilent Technologies)를 장착하여 사용하였다. 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 carbohydrate 칼럼(4.6 \times 250 mm, 5 μm , Agilent Technologies)에 이동상 용액 75%(v/v) 아세트나이트릴을 분당 1.0 mL 유속으로 25분 동안 분석하였다. 표준품은 Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)에서 생산하는 D(-)-과당(99.5%), α -D(+)-포도당(99.5%), D(+)-saccharose(99.5%)를 구매하여 사용하였다.

2. 2. 9. 무기질 분석

분말 오디 약 0.5 g과 질산(Wako Pure Chemical Industries) 10 mL를 마이크로파용 PTFE vessel (OMNI/XP 1500, CEM Co., Matthews, NC, USA)에 넣고 16시간 동안 상온 방치하여 예비 분해한 후, micro digestion system (MARS 5, CEM Co.)을 이용하여 800 W의 출력으로 15분 동안 190℃까지 올린 후 10분 유지하고 30분 동안 상온에 이르게 하여 분해하였다. 분해한 시료는 증류수로 희석하여 부피플라스크에 50 mL까지 채운 후 inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES; Varian 730-ES, Melbourne, VIC, Australia)를 이용하여 분석하였고, 무기질 분석을 위하여 혼합 표준용액(ICP multi-element standard solution, Merck Chemicals)을 사용하였다. 분석법의 적합성을 검증하고자 인증표준물질(Certified reference material; CRM-3244, ephedra-containing protein powder, NIST, Gaithersburg, MD, USA)을 동시에 분석하여 회수율을 측정하였다.

2. 2. 10. GABA와 아미노산 분석

GABA는 아미노산자동분석기(Hitachi L-8800, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 분말 오디 약 0.5 g에 3% (w/v) 트라이클로로아세트산(Wako Pure Chemical Industries) 10 mL를 넣어 격렬히 진탕하고 40℃에서 1시간 동안 초음파 추출

하였다. 5분간 1,717×g로 원심분리 후 상층액을 회수하였고, 하층 잔여물은 다시 추출하여 상층액을 모아 3% 트라이클로로아세트산으로 부피플라스크에 25 mL까지 채웠다. 이 추출액을 0.45 µm 나일론 필터로 여과한 후 분석하였다.

오디의 아미노산은 다음과 같이 염산(Wako Pure Chemical Industries)으로 가수분해하여 아미노산분석기로 분석하였다. 시험관에 분말 오디 약 0.2 g과 6 N 염산 8 mL를 넣고 질소로 충전한 후 밀봉하여 24시간 동안 110℃로 가열하였다. 분해된 용액을 60℃에서 질소로 건조시킨 후 0.02 N 염산으로 녹여 부피플라스크에 20 mL로 채웠고, 활성화시킨 C18 Sep-Pak cartridge (Waters Co., Milford, MA, USA)로 정제하여 분석에 사용하였다. 분석법의 적합성을 검증하고자 인증표준물질을 동시에 분석하여 회수율을 측정하였고, 아미노산혼합표준용액(Wako Pure Chemical Industries)을 사용하여 각 아미노산과 GABA를 정성·정량 분석하였다.

2. 2. 11. 페놀 화합물과 산화방지 활성 분석을 위한 추출물 제조

추출물 제조는 분말 오디 약 1.5 g에 80% (v/v) 에탄올 20 mL를 혼합하여 30분 동안 초음파 추출 후 40℃의 수욕조 상에서 1시간 동안 진탕하였다. 5분간 1,717×g로 원심분리 후 상층액을 회수하고 잔여물을 2번 더 반복하여 추출하였다. 회수된 상층액을 모아 여과(E&K Scientific Products, Santa Clara, CA, USA)하고 40℃로 농축(Büchi Rotavapor and Heating Bath, Büchi)한 후 건조물을

증류수에 녹이고 부피플라스크에 25 mL까지 채운 후 -22°C 에서 냉동 보관하며 분석에 사용하였다.

2. 2. 12. Proanthocyanidin 함량

Proanthocyanidin은 Prior 등(2010)의 방법에 따라 측정하였다. 산성 에탄올은 염산 12.5 mL와 물 12.5 mL를 91% 에탄올 75 mL에 넣어 조제하였으며, DMAC 시약은 DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.05 g을 산성 에탄올 50 mL에 녹여서 0.1% 농도로 만들었다. 추출물 용액과 표준품(catechin, Sigma-Aldrich Co.) 용액 70 μL 을 DMAC 시약 210 μL 와 반응시키고 상온에서 10분간 방치한 후 640 nm에서 측정하였다. DMAC 시약을 제외한 시험용액을 바탕시험으로 하여 표준용액의 농도별 보정선으로 proanthocyanidin 함량을 산출하였고, catechin equivalent (eq) mg/100 g (db)으로 나타냈다.

2. 2. 13. 총 polyphenol 함량

총 polyphenol 함량은 Folin-Ciocalteu 방법(Singleton 등, 1999)에 따라 측정하였다. 추출물 용액 0.1 mL를 증류수 0.4 mL와 0.2 N Folin-Ciocalteu 시약(Sigma-Aldrich Co.) 2.5 mL로 혼합하고 5분간 상온에서 반응시킨 후 다시 7.5% (w/v) 탄산소듐(Wako Pure Chemical Industries) 2 mL를 넣고 1시간 동안 암소

에 상온 방치하였다. 이후 자외선-가시광선 분광광도계 (Agilent Technologies)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였고, gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 하여 총 polyphenol은 gallic acid eq mg/100 g (db)으로 산출하였다.

2. 2. 14. 총 flavonoid 함량

총 flavonoid는 비색법(Arvouet-Grand 등, 1994)으로 분석하였다. 추출물 용액 0.2 mL와 에탄올 2 mL, 10% (w/v) 질산알루미늄(Wako Pure Chemical Industries) 0.1 mL를 혼합한 후, 1.0 M 아세트산포타슘(Wako Pure Chemical Industries) 0.1 mL와 증류수 2.6 mL를 넣어 40분간 상온에서 반응시켰다. 바탕시험으로 10% (w/v) 질산알루미늄 대신 증류수를 넣어 동시에 분석을 진행하였고, 흡광도는 415 nm에서 측정하였다. Quercetin hydrate (Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하여 quercetin eq mg/100 g (db)으로 총 flavonoid 함량을 산출하였다.

2. 2. 15. 총 anthocyanin 함량

총 anthocyanin은 pH differential method (AOAC, 2005)에 의하여 분석하였다. 희석배수를 고려하여 추출물 용액 1-2 mL를 50 mL 부피플라스크에 넣고, pH 1.0 완충용액(0.025 M 염화포타슘, Wako Pure Chemical Industries)과 pH 4.5 완충용액(0.4 M 아세트산소듐, Yakuri Pure Chemicals Co., Kyoto, Japan)으로 각각 따

로 채웠다. 30분 동안 상온에 방치한 후 자외선-가시광선 분광광도계를 이용하여 520 nm와 700 nm에서 측정하였고, 아래의 수식에 따라서 anthocyanin 함량을 계산하였다.

$$\text{anthocyanin 함량 (cyanidin-3-gulcoside eq mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon}$$

$$A : (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4.5}$$

$$MW : \text{cyanidin-3-gulcoside의 분자량} = 449.2 \text{ g/mol}$$

$$DF : \text{희석배수}$$

$$\epsilon : \text{몰흡광계수} = 26,900$$

2. 2. 16. 페놀 화합물의 HPLC 분석

추출물 용액에 함유되어 있는 페놀 화합물은 HPLC (Acquity UPLC H-Class, Waters)를 이용하여 Table 1의 조건으로 분석하였다. 칼럼 오븐은 30℃를 유지하며 Capcell Pak C18 칼럼(4.6 mm×250 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였다. Protocatechuic acid와 ellagic acid는 254 nm, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid는 320 nm, rutin은 360 nm, 그리고 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside는 520 nm에서 정량하였다. 정성과 정량은 각 표준물질(Sigma-Aldrich Co.)의 자외선-가시광선 스펙트럼과 머무름 시간을 비교하여 분석하였다.

Table 1. Operating conditions of HPLC-PDA for analysis of phenolic compounds

Mobile solvent	A : 1% formic acid, B : methanol					
Injection volume	10 μ L					
Column temperature	30°C					
PDA Scan	200-800 nm					
Flow rate	1.0 mL/min					
Pump gradient program	Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	95	5	40.0	55	45
	5.0	95	5	50.0	40	60
	10.0	90	10	55.0	40	60
	15.0	90	10	60.0	5	95
	20.0	80	20	65.0	5	95
	25.0	80	20	70.0	95	5
	30.0	70	30	75.0	95	5

2. 2. 17. DPPH 자유라디칼 제거활성 측정

추출물 용액의 산화방지 활성은 Brand-Williams 등(1995)의 방법에 따라 DPPH 자유라디칼 제거활성을 측정하여 구하였다. 희석한 추출물 용액 0.1 mL를 0.1 mM DPPH 메탄올 용액(Sigma-Aldrich Co.) 3.9 mL와 혼합하고 암소에 30분 동안 상온 방치한 후 517 nm에서 측정하였다. 추출물 용액 대신 증류수를 넣은 바탕시험을 동시에 실시하였고, DPPH 자유라디칼 제거활성은 trolox (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, $\mu\text{mol}/100\text{ g (db)}$)로 산출하였다.

2. 2. 18. ABTS 자유라디칼 제거활성 측정

ABTS 자유라디칼 제거활성은 Re 등의 방법(1999)으로 측정하였다. 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich Co.) 용액과 2.45 mM 과황산포타슘(Sigma-Aldrich Co.) 용액을 혼합하여 암소에 18시간 상온 방치 후 흡광도 값이 약 $0.7(\pm 0.02)$ 이 되도록 에탄올로 희석하여 반응용액으로 사용하였다. 희석한 추출물 용액 0.4 mL와 반응용액 3.6 mL를 1분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 시험용액 대신 증류수로 반응시킨 바탕시험을 동시에 실시하였으며, trolox 표준물질로 보정선을 작성하여 TEAC ($\mu\text{mol}/100\text{ g (db)}$)를 산출하였다.

2. 2. 19. 통계 분석

실험 결과와 통계처리는 SPSS 프로그램(SPSS version 20.0, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 일원배치분산분석과 사후검증으로 튜키시험을 실시하여 실험군 간의 통계적 유의성($P<0.05$)을 평가하였다. 총 polyphenol, anthocyanin과 산화방지 활성 간의 상관분석은 피어슨 상관계수 R과 P -value로 나타내었다.

2. 3. 결과와 고찰

2. 3. 1. 색도

오디가 익어가는 과정 중 과피의 색도 변화를 Table 2에 나타내었다. 오디가 익을수록 명도(L값)는 43.2(MS-1)에서 16.9(MS-7)로 감소하였다. 이 결과는 성숙도가 증가함에 따라 L값이 감소한다는 Lin과 Lay(2013)의 결과와도 일치하였다. 황색도(b값) 또한 24.0(MS-1)에서 -0.5(MS-7)로 감소하였으나, 적색도(a값)는 초기에 9.4에서 MS-4에 24.5까지 증가하다가 다시 완숙기에 0.1까지 감소하였다.

Table 2. Changes in Hunter's color values of mulberry during ripening

	L (Lightness)	a (Redness)	b (Yellowness)
MS-0	48.9±6.3 a	-4.6±3.8 f	32.2±3.5 a
MS-1	43.2±4.6 b	9.4±4.0 d	24.0±4.0 b
MS-2	41.8±5.9 b	18.3±7.1 b	20.0±4.3 c
MS-3	37.5±4.7 c	24.5±6.0 a	16.0±2.9 d
MS-4	29.8±3.9 d	20.1±6.4 b	9.6±4.0 e
MS-5	17.7±0.8 e	4.5±3.5 d	0.6±0.9 f
MS-6	16.7±0.6 e	0.2±0.8 e	-0.5±0.3 f
MS-7	16.9±0.8 e	0.1±0.1 e	-0.5±0.1 f

MS, maturity stage. Values are means \pm standard deviations (n=10). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

2. 3. 2. 크기, 무게, 경도

오디가 익어가는 동안의 크기, 무게, 경도의 변화를 Table 3에 나타내었다. 길이, 너비, 두께는 증가하였고, 무게는 오디 1개당 약 0.58 g(MS-1)에서 3.39 g(MS-7)으로 증가하였다. 이는 오디가 익을수록 0.71-2.68 g으로 증가한다는 기존의 연구(Lin과 Lay, 2013)와 일치하였고, 오디의 무게가 3.49 g이라는 Ercisli와 Orhan(2007)의 보고와도 유사한 결과였다. 이와는 반대로, 오디의 경도는 익어감에 따라 12.7에서 1.1 kgf으로 급격히 감소하였으며, 특히 중후반기(MS-5) 이후 급격한 변화를 보였다. 오디와 같은 다육과 혹은 액과는 익어가는 과정에 펙틴질 중합체가 분해되어 단위체가 생성되고, 수용성 폴리유로나이드가 증가하는 성분 조성을 동반하여 구조적 변화가 진행된다(Brady, 1987). 이러한 변화는 조직의 연화와 함께 미생물 증식이 용이해지고, 그 결과 과일의 품질이 저하된다(Brady, 1987). 박 등(2013)은 80-100% 성숙 오디를 저장하는 동안 곰팡이 수는 성숙도가 높을수록 더 많이 증가하였다고 보고하였다. 따라서 경도가 급격히 낮아지는 성숙 중후반기의 완숙과가 미숙과보다 저장성 측면에서는 불리하다고 볼 수 있다.

Table 3. Changes in size, weight, and firmness of mulberry during ripening

	Size (mm)			Weight (g/10 fruits)	Firmness (kg _f)
	Length	Width	Thickness		
MS-1	17.5±2.5 e	9.7±1.0 e	8.6±0.7 e	5.8±0.3 e	10.8±2.0 a
MS-2	19.8±0.9 d	10.3±0.7 de	8.8±0.3 e	7.7±0.5 e	12.7±1.9 a
MS-3	21.3±1.6 cd	11.2±0.7 d	9.8±0.7 d	10.4±0.7 d	11.7±2.5 a
MS-4	22.4±1.0 bc	12.8±0.6 c	10.7±0.7 c	14.9±1.2 c	7.9±1.9 b
MS-5	23.8±1.9 ab	13.8±1.0 b	12.2±0.8 b	21.1±2.5 b	5.3±1.5 c
MS-6	24.5±1.4 a	15.2±1.1 a	13.5±1.0 a	32.9±2.1 a	1.5±0.6 d
MS-7	25.2±1.6 a	14.9±0.8 a	13.2±1.0 a	33.9±1.8 a	1.1±0.2 d

MS, maturity stage. Values are means ± standard deviations (n=10). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

2. 3. 3. 일반성분

오디의 일반성분은 Table 4에 나타내었다. 오디가 익어감에 따라 조회분(8.3–4.3 g/100 g, (db)), 조단백질(18.1–5.8 g/100 g), 조섬유(41.0–12.7 g/100 g)는 유의적으로($P<0.05$) 감소한 반면, 수분 함량(84.4–89.7 g/100 g)은 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 4 단계의 성숙도에 따라 수분함량이 80–88%, 7개 품종 오디의 수분함량이 84–86%라는 기존의 연구(Lin과 Lay, 2013; Kim 등, 2010)와 유사하였고, 블랙라즈베리가 성숙함에 따라 조회분 함량이 감소하는 결과와도 유사하였다(Kim 등, 2011). 한편, 조지방은 중반(MS-3)까지 10.5에서 18.0 g/100 g으로 증가하다가, 완숙기에 다시 감소하였다(8.3 g/100 g).

Table 4. Changes in proximate composition of mulberry during ripening

	Moisture (g/100 g, wb)	Crude ash (g/100 g, db)	Crude protein (g/100 g, db)	Crude fat (g/100 g, db)	Fiber (g/100 g, db)
MS-1	84.4±0.1 d	8.3±0.5 a	18.1±0.1 a	10.5±0.9 bc	39.4±4.6 a
MS-2	87.1±0.0 b	7.6±0.2 ab	16.7±0.4 b	12.2±1.2 b	41.0±3.1 a
MS-3	86.7±0.1 b	7.3±0.3 bc	13.7±0.9 c	18.0±0.2 a	39.6±5.7 a
MS-4	89.7±0.1 a	6.8±0.3 cd	13.3±0.1 c	17.3±0.5 a	27.9±4.2 ab
MS-5	89.1±0.2 a	6.3±0.2 d	11.7±0.2 d	16.2±1.1 a	22.6±6.3 c
MS-6	85.7±0.7 c	4.3±0.3 e	6.6±0.2 e	8.8±1.1 c	15.4±0.9 c
MS-7	86.9±0.4 b	4.3±0.2 e	5.8±0.6 e	8.3±0.3 c	12.7±0.7 c

MS, maturity stage; wb, wet basis; db, dry basis. Values are means ± standard deviations (moisture, crude ash, protein, and fat, n=3; fiber, n=2). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

2. 3. 4. pH, 산도, 고형물, 유리당, ascorbic acid

Table 5에 나타낸 바와 같이, 오디즙의 고형물은 5.6–13.7브릭스였고 pH는 3.5–5.5로 익는 과정 동안 증가하는 경향이었다. 반면 산도는 2.4에서 0.3 g/100 mL로 감소하였다. 고형물, 산도, pH는 오디즙이 충분하지 않아서 일회만 분석하였다. Lin 등(2013)은 이와 유사한 경향으로 성숙도에 따른 오디의 고형물은 7.5–9.0브릭스이고 pH는 3.0–3.2라고 보고하였고, Ercisli와 Orhan(2007) 또한 완숙 오디의 pH와 산도가 각각 5.6과 0.25%라고 하였다. 익는 과정 중 고형물의 증가와 산도의 감소는 maturity index ($^{\circ}\text{Brix}:\text{acid ratio}$)로 표현할 수 있으며, Siriwoharm 등(2004)은 익는 과정 중 2개 품종 블랙베리의 maturity index가 각각 4.2에서 12.6과 4.6에서 38.3으로 급격히 증가한다고 보고하였고, 이는 본 연구의 결과와 유사하였다. 낮은 pH와 높은 농도의 산도는 과일의 저장에 매우 중요하기 때문에 성숙도가 증가할수록 저장에 따른 품질은 저하된다(Viljakainen 등, 2002). 유리당 함량은 익는 과정 동안 유의적으로($P<0.05$) 증가하였고(2.4–26.6 g/100 g (db)), 포도당과 과당은 같은 수준으로 증가하였다(표 11). 특히 완숙기(MS-5–7)에 이르러 급격히 증가하여, 완숙기의 유리당 함량은 미숙기보다 10배 가까이 높았다.

Table 5. Changes in pH, acidity, soluble solid, ascorbic acid, and free sugars of mulberry during ripening

	pH	Acidity (as citric acid, g/100 mL FJ)	Soluble solid (°Brix FJ)	Ascorbic acid (mg/100 g, db)	Free sugars (g/100 g, db)			
					Glucose	Fructose	Sucrose	Total
MS-1	3.9	1.8	5.9	20.1±0.9 c	nd	1.2±0.3 c	2.0±0.6 c	3.3±0.9 c
MS-2	3.5	2.2	5.6	16.3±0.5 d	0.4±0.7 c	0.8±0.1 c	1.2±0.1 d	2.4±0.9 c
MS-3	3.5	2.4	5.8	18.8±0.8 cd	1.2±0.1 c	1.0±0.0 c	1.1±0.1 d	3.4±0.2 c
MS-4	3.6	1.8	5.8	24.5±0.7 b	2.4±0.3 bc	2.0±0.3 bc	1.4±0.3 cd	5.9±0.9 c
MS-5	3.7	1.3	7.5	44.5±2.0 a	5.0±0.2 b	4.9±0.1 b	1.6±0.1 cd	11.5±0.3 b
MS-6	5.0	0.4	13.4	11.3±0.7 e	10.8±2.3 a	12.5±0.7 a	3.3±0.3 b	26.7±1.5 a
MS-7	5.5	0.3	13.7	16.7±0.6 d	10.6±1.6 a	10.2±2.8 a	5.1±0.1 a	25.9±4.2 a

MS, maturity stage; FJ, fruit juice; db, dry basis; nd, not detected. Values are means ± standard deviations (ascorbic acids, n=2; free sugars, n=3). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

HPLC를 이용하여 오디에 함유된 ascorbic acid의 피크를 성공적으로 분리하였다. 표준품을 이용하여 정량한 ascorbic acid 함량은 11.3–44.5 mg/100 g (db)의 범위였고, 특히 MS-5의 함량이 가장 높았으며, MS-6이 가장 낮았다. Ercisli와 Orhan(2007)은 3개 품종 오디즙의 ascorbic acid 함량이 19.4–22.4 mg/100 mL라고 보고하였다.

2. 3. 5. 무기질 함량

ICP-OES를 이용하여 무기질 함량을 분석한 결과는 Table 6에 제시하였다. 먼저 동일 분석법으로 CRM에 함유된 무기질의 회수율을 검증한 결과, 포타슘, 칼슘, 마그네슘, 소듐, 망가니즈, 구리 모두 80% 이상의 회수율을 보였다. 소듐을 제외하고 모든 무기질은 오디가 익어갈수록 유의적으로($P<0.05$) 감소하여, 총 무기질 함량은 3.1–1.5 g/100 g (db) 범위였다. 포타슘, 칼슘, 마그네슘이 주요 무기질이었고, 소듐, 철, 망가니즈, 아연, 구리가 미량으로 함유되어 있었다. 이는 블랙라즈베리가 성숙함에 따라 무기질 함량이 감소한다는 연구 결과(Kim과 Shin, 2011; Cha 등, 2007)와 블랙라즈베리(Kim과 Shin, 2011; Cha 등, 2007)와 오디(Ercisli와 Orhan, 2007)에 함유된 주요 무기질이 포타슘, 칼슘, 마그네슘이라는 보고와 일치하는 결과였다.

Table 6. Changes in mineral content of mulberry during ripening (mg/100 g, dry basis)

	K	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Zn	Cu	Total
MS-1	1915.8±54.9 a	841.9±39.5 a	271.6±2.7 a	30.5±7.5	7.8±1.2 a	3.6±0.1 a	2.9±0.6 a	0.6±0.1 a	3074.8±13.9 a
MS-2	1862.2±76.3 ab	621.7±20.3 b	230.9±9.4 b	26.2±2.8	6.3±0.3 ab	3.1±0.2 b	2.2±0.1 b	0.5±0.0 ab	2813.0±13.3 b
MS-3	1959.9±57.9 a	554.2±15.8 c	210.2±5.1 c	30.2±9.8	6.7±1.3 ab	2.8±0.1 c	2.0±0.1 b	0.5±0.1 ab	2719.5±22.5 b
MS-4	1733.6±72.7 bc	465.1±15.4 d	187.3±5.6 d	23.4±2.7	5.9±1.6 abc	2.5±0.1 cd	1.7±0.1 bc	0.5±0.0 b	2472.0±6.6 c
MS-5	1671.2±7.4 c	464.9±9.6 d	179.3±0.7 d	27.5±3.6	5.0±0.1 bcd	2.4±0.0 d	1.7±0.0 bcd	0.5±0.0 b	2352.5±17.2 c
MS-6	1215.2±13.5 d	267.9±7.2 e	114.2±0.9 e	23.6±4.4	3.2±0.5 d	1.5±0.0 e	1.1±0.1 cd	0.3±0.0 c	1626.9±24.3 d
MS-7	1173.6±9.8 d	234.0±6.0 e	101.9±0.8 e	20.7±1.5	3.4±0.4 cd	1.4±0.0 e	1.0±0.2 d	0.3±0.0 c	1536.3±10.5 d
CRM (recovery, %)	87.0±5.8	106.6±0.9	95.9±1.2	83.9±10.7	—	103.5±1.9	—	128.3±38.7	—

MS, maturity stage; CRM, certified reference material. Values are means and means ± standard deviations (n=3). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

2. 3. 6. 아미노산과 GABA

아미노산과 GABA 함량은 Table 7에 나타내었다. 오디 시료와 동일한 전처리 방법으로 CRM에 함유된 아미노산을 분석한 결과, methionine과 alanine을 제외하고 모든 아미노산이 80% 이상의 회수율을 보였다. 한편, 단백질 함량에 대한 아미노산 회수율은 MS-1-7에서 약 90% 이상이었다. 오디에 함유된 주요 아미노산은 aspartic acid와 glutamic acid, arginine, lysine, leucine이었다. 오디가 익어감에 따라 필수아미노산(threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine)을 비롯한 모든 아미노산은 감소하였다. 이는 미숙기와 완숙기의 블랙라즈베리에 함유된 주요 아미노산이 aspartic acid와 glutamic acid라는 보고와 일치하였다(Cha 등, 2007). Methionine과 proline 함량은 미숙기와 완숙기 오디 사이에 유의적인 차이가 없었다. 오디가 익어감에 따라 총 아미노산은 15.9에서 5.2 g/100 g (db)으로 급격히 감소하였다. 완숙 오디의 아미노산 함량(MS-6과 7; 각각 5.8과 5.2 g/100 g)은 50종류의 뽕나무 계통별 완숙 오디 아미노산 함량(3.4-6.9%)을 분석한 연구(Kim 등, 2004)와 유사한 결과를 보였다. 미숙 오디(MS-1과 2; 각각 113.2와 59.6 mg/ 100 g)의 GABA 함량이 나머지 시기의 오디(MS-3-6, 17.1-33.6 mg/100 g)보다 유의적으로($P<0.05$) 높았다. GABA는 많은 식물체와 식품 등에 존재하며, 수축기 혈압 상승을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다(Hayakawa 등, 2004).

Table 7. Changes in amino acids and γ -aminobutyric acid (GABA) of mulberry during ripening (g/100 g, dry basis)

	MS-1	MS-2	MS-3	MS-4	MS-5	MS-6	MS-7	CRM (recovery, %)
Asp	2.9 a	2.4 b	1.8 c	1.6 d	1.4 d	0.7 e	0.6 e	93.9
Thr	0.6 a	0.6 b	0.5 c	0.4 d	0.4 e	0.2 f	0.2 f	91.5
Ser	0.8 a	0.7 ab	0.7 b	0.6 c	0.5 d	0.3 e	0.3 e	94.2
Glu	2.1 ab	2.1 ab	2.1 a	1.9 b	1.7 c	1.0 d	0.9 d	91.5
Pro	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	86.6
Gly	0.7 a	0.7 b	0.6 c	0.6 d	0.5 e	0.3 f	0.3 f	—
Ala	0.8 a	0.7 a	0.6 b	0.6 bc	0.5 c	0.3 d	0.3 d	73.9
Cys	0.1 ab	0.1 a	0.1 a	0.1 ab	0.1 b	0.1 c	0.0 c	82.6
Val	0.8 a	0.8 b	0.7 c	0.6 d	0.6 e	0.3 f	0.3 f	93.4
Met	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	51.1
Ilu	0.6 a	0.6 a	0.5 b	0.5 c	0.4 d	0.2 e	0.2 e	91.3
Leu	1.1 a	1.0 ab	0.9 bc	0.9 cd	0.8 d	0.4 e	0.4 e	90.4
Tyr	0.5 a	0.5 ab	0.4 bc	0.4 cd	0.4 d	0.2 e	0.2 e	84.8
Phe	0.8 a	0.8 a	0.7 b	0.6 b	0.5 c	0.3 d	0.3 d	93.7
Lys	1.4 a	1.3 ab	1.0 ab	1.0 ab	0.9 bc	0.4 cd	0.4 d	108.3
NH ₃	0.5 a	0.5 a	0.4 b	0.3 b	0.3 b	0.2 c	0.1 c	—
His	0.6 ab	0.6 a	0.5 ab	0.4 ab	0.5 ab	0.2 ab	0.1 b	96.7
Arg	1.3 a	1.3 a	1.3 a	1.2 a	1.0 b	0.5 c	0.5 c	92.7
Total	15.9 a	14.9 a	13.4 b	12.2 c	10.8 d	5.8 e	5.2 e	
GABA (mg/ 100 g)	113.2 a	59.6 b	21.1 c	17.1c	18.4 c	33.6 c	42.1 bc	

MS, maturity stage; CRM, certified reference material. Values are means (n=3). Values with different lower case letters within the same rows are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

2. 3. 7. Proanthocyanidin 함량

오디 추출물의 proanthocyanidin 함량은 MS-2-4(20.2-35.3 mg/100 g (db))에서 유의적으로($P<0.05$) 높았고, 미숙 오디에 비해 완숙 오디(MS-6과 7; 각각 4.1과 8.9 mg/100 g)는 낮은 경향이 있었다(Table 8). Proanthocyanidin은 축합형 tannin으로 oligomeric flavonoid로 이루어져 있다. Proanthocyanidin의 역할은 식물체 내에서 기관과 조직에 축적되어 여러 외부 요인에 방어 기능을 하며, 식품의 산화방지제로서 암, 심장질환, 알츠하이머 등의 질병 예방에 효과가 있다고 알려져 있다(Gang, 2011).

Table 8. Changes in proanthocyanidins of mulberry during ripening

Proanthocyanidins (catechin eq mg/100 g, dry basis)	
MS-1	11.3±5.1 cd
MS-2	21.2±8.9 b
MS-3	35.3±3.5 a
MS-4	20.0±5.3 bc
MS-5	11.3±2.7 cd
MS-6	4.1±1.0 d
MS-7	8.9±2.9 d

MS, maturity stage; eq, equivalent. Values are means ± standard deviations (n=3).

Values with different lower case letters are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

2. 3. 8. 총 polyphenol, anthocyanin, flavonoid 함량

오디에 함유된 총 polyphenol, anthocyanin, flavonoid 함량은 Figure 3에 제시하였다. 오디가 익어감에 따라 총 polyphenol은 1.1–3.2 g/100 g (db) 범위로 MS-5 이후 급격히 증가하였고, 총 anthocyanin 또한 0.0–2.0 g/100 g의 범위로 MS-4 이후 급격히 증가하였다. 총 flavonoid는 0.1–0.4 g/100 g의 범위로 중반까지 감소하다가 MS-4 이후 증가하였다. 이러한 결과는 오디가 익어갈수록 총 polyphenol과 anthocyanin이 증가한다는 기존의 연구(Lou 등, 2012)와도 일치하였다. 그러나 12개 오디 품종의 총 anthocyanin과 flavonoid가 각각 0.4–3.3 g/100 g과 0.03–0.15 g/100 g이라는 보고(Song 등, 2009)와 7개 품종에서는 0.7–1.2 g/100 g와 0.1–0.3 g/100 g이라는 보고(Kim 등, 2010)와는 차이를 보였다. 베리에 함유된 페놀 화합물 함량은 성숙도, 유전적 다양성, 환경 요소 등 다양한 요인들에 의해 차이가 발생한다고 알려져 있다(Pawlowska 등, 2008; Moyer 등, 2002; Zadernowski 등, 2005). Folin-Ciocalteu 반응은 비색 분석법의 하나로서, 총 polyphenol을 측정하는데 주로 사용한다. 그러나 Folin-Ciocalteu 시약은 polyphenol뿐만 아니라 식품에 존재하는 환원 물질과도 반응을 일으킬 수 있으므로, 유리당과 ascorbic acid가 총 polyphenol 함량을 측정하는데 방해가 될 수 있다(George 등, 2005).

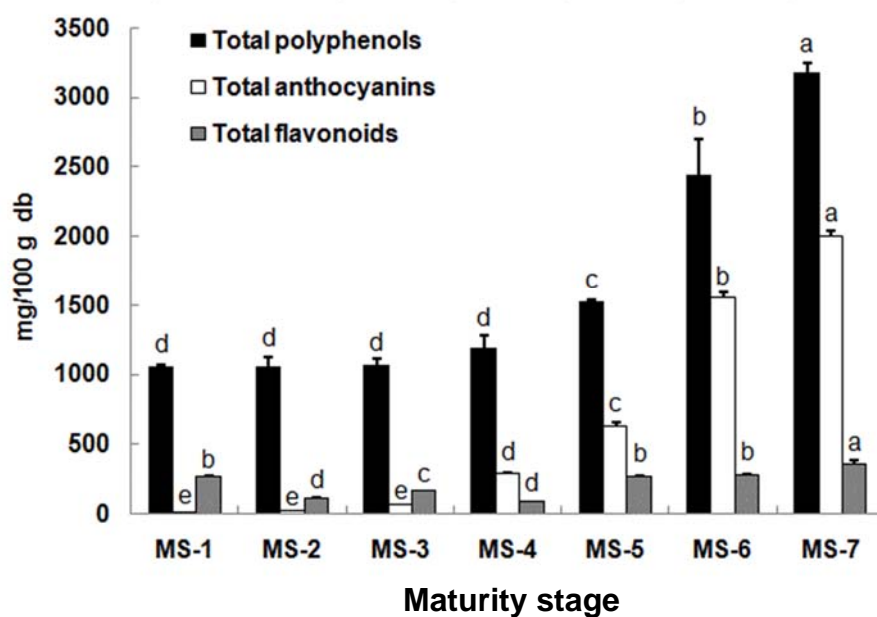


Figure 3. Changes in total polyphenols (TP), total anthocyanins (TA), and total flavonoids (TF) of mulberry during ripening. MS, maturity stage; db, dry basis. TP is expressed as gallic acid equivalent mg per 100 g (db). TA is expressed as cyanidin-3-glucoside equivalent mg per 100 g (db). TF is expressed as quercetin equivalent mg per 100 g (db). Bars represent means \pm standard deviations ($n=3$). Different letters (a-e) above the bars within each group of TP, TA, and TF indicate significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

높은 농도로 존재하는 포도당과 과당과 같은 환원당이 총 polyphenol 함량을 높게 측정하도록 하는데 기여할 수 있으므로 (George 등, 2005), 미숙 오디에 비해 완숙 오디에 다량 함유된 유리당으로 인해 완숙기의 총 polyphenol이 급격히 높아지는 결과가 나타났을 가능성이 있다. 따라서, 총 polyphenol을 더 정확하게 측정하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

2. 3. 9. 페놀 화합물의 HPLC 분석

HPLC를 이용하여 개별 페놀 화합물을 분석한 결과는 Table 9에 나타내었다. 오디가 익어감에 따라, phenolic acid와 rutin은 감소하는 경향이었고, 반면에 anthocyanin은 증가하였다. 오디의 주요 anthocyanin은 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside였으며, cyanidin-3-glucoside가 cyanidin-3-rutinoside보다 2배 이상 높았고(Pawlowska 등, 2008; Kim 등, 2010; Bae와 Suh, 2007), anthocyanin은 익어감에 따라 페놀 화합물 대비 1%에서 87%로 급격히 증가하였다. 성숙도가 증가함에 따라, protocatechuic acid와 ferulic acid는 약간 증가하는 경향이었으나, chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid는 감소하였다. 특히, chlorogenic acid 함량은 3.92에서 0.58 mg/100 g (db)까지 유의적으로($P<0.05$) 감소하였다. 미숙 오디(MS-1-3)는 완숙 오디(MS-6, 7)보다 6배나 많은 chlorogenic acid를 함유하고 있었다.

Table 9. Changes in phenolic compounds of mulberry during ripening (mg/kg, dry basis)

	Protocatechuic acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Ferulic acid	Ellagic acid	Rutin	Cyanidin-3-glucoside	Cyanidin-3-rutinoside
MS-1	6.1±0.4 cd	3923.9±124.8 a	471.7±15.5 a	2.1±0.3 c	539.8±117.6 a	699.0±46.5 a	33.3±8.0 c	23.5±4.5 d
MS-2	5.4±0.3 cd	3899.7±76.8 a	460.4±8.1 a	1.0±0.2 c	481.8±130.5 ab	671.8±55.4 ab	75.7±3.8 c	62.8±2.0 d
MS-3	nd	3527.6±80.1 b	434.5±8.5 b	1.1±1.1 c	477.7±112.0 ab	635.5±64.1 ab	353.0±9.3 c	191.8±4.0 d
MS-4	7.0±2.3 c	2698.0±92.2 c	350.6±11.5 c	1.3±0.1 c	405.9±26.1 ab	664.6±23.4 ab	1919.7±79.3 c	737.3±14.5 c
MS-5	11.3±2.6 c	2141.4±6.1 d	287.8±0.7 d	1.3±0.1 c	288.3±37.5 ab	617.8±14.0b c	4526.9±202.6 b	1591.7±26.2 b
MS-6	28.8±4.5 b	523.6±15.2 e	75.4±2.3 e	13.1±1.9 a	132.3±20.5 b	583.9±36.0 c	7522.4±2136.6 a	2836.3±411.1 a
MS-7	43.4±3.2 a	582.4±18.2 e	90.9±0.8 e	10.0±0.5 b	122.9±10.3 ab	592.0±23.2 c	6262.3±641.5 a	3031.3±131.5 a

MS, maturity stage; nd, not detected. Values are means ± standard deviations (n=3). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Tukey's test at $P<0.05$.

오디가 익는 동안 페놀 화합물 대비 chlorogenic acid는 69%에서 5%로 급격히 감소하였다. Chlorogenic acid는 glucose-6-phosphatase 억제제로 간에서 포도당의 방출 속도를 줄여주고 혈중 포도당 농도를 낮춰준다(Schindler 등, 1998). Bassoli 등(2008)은 chlorogenic acid가 쥐 간 microsome에서 glucose-6-phosphatase 활성을 40%까지, 그리고 쥐 소장에서 분리한 미세음모막 vesicle의 포도당 수송 능력을 80%까지 억제하였다고 보고하였다. 또한 오디에 chlorogenic acid와 rutin은 아세트산에틸 분획물에 풍부하였고(Zhang 등, 2008), 특히 아세트산에틸 분획물이 다른 분획물(에탄올 추출물, 헥세인, 클로로폼, 뷰탄올, 물 분획물)에 비해 α -glucosidase와 라디칼 제거활성이 높았으며, streptozotocin으로 유도된 비만 쥐에서 공복 혈당과 당화 혈청단백질을 유의적으로 감소시키고 산화방지 효소 활성을 증가시켰다(Wang 등, 2013). 이는 chlorogenic acid가 풍부한 미숙 오디는 기능성 식품 소재로 잠재적 이용 가능성이 높음을 가리킨다.

일부 연구에서 quercetin과 kaempferol 유도체, scopoletin, morin 등의 여러 페놀 화합물이 오디에 함유되어 있다고 보고되고 있으므로(Lee 등, 2004; Pawlowska 등, 2008; Kim 등, 2010; Lin과 Lay, 2013), 오디가 익는 과정 동안 이러한 여러 페놀 화합물 함량의 변화를 조사하는 추가적인 연구를 수행할 필요가 있다.

2. 3. 10. 산화방지 활성

오디의 산화방지 활성은 DPPH와 ABTS 자유라디칼 제거활성을

TEAC로 산출하였다. 오디의 DPPH와 ABTS 자유라디칼 제거활성은 각각 0.16–0.66 mmol/100 g (db)과 0.39–1.92 mmol/100 g 범위로 익어감에 따라 증가하였고, 특히 마지막 완숙기에 급격하게 증가하였다(Figure 4). DPPH와 ABTS 자유라디칼 제거활성은 총 polyphenol과 anthocyanin과의 상관계수가 0.99 이상인 정의 상관관계($P<0.01$)가 있었다. 이 결과는 4종 베리의 산화방지 활성(DPPH와 ABTS 자유라디칼 제거활성)과 총 polyphenol, anthocyanin이 정의 상관관계(correlation coefficient >0.85 , $P<0.01$)였다는 보고(Lee 등, 2015)와 성숙도에 따른 라즈베리의 ORAC 값과 DPPH 자유라디칼 역시 총 polyphenol과 정의 상관관계라는 보고(Wang 등, 2009)와도 유사하였다. 더욱이 총 polyphenol과 DPPH와 ABTS 자유라디칼 제거활성이 오디가 익어감에 따라 증가하는 경향과 총 polyphenol이 산화방지능에 효과를 주는 주요 화합물이라는 결과는 Lou 등(2012)의 연구와 유사하였다. Oki 등(2006)은 완숙 오디에 DPPH 자유라디칼 제거능력이 가장 큰 것을 관찰하였고, 완숙 오디에는 anthocyanin이, 미숙 오디에는 chlorogenic acid가 산화방지 활성에 주로 기여하는 화합물이라고 보고하였다.

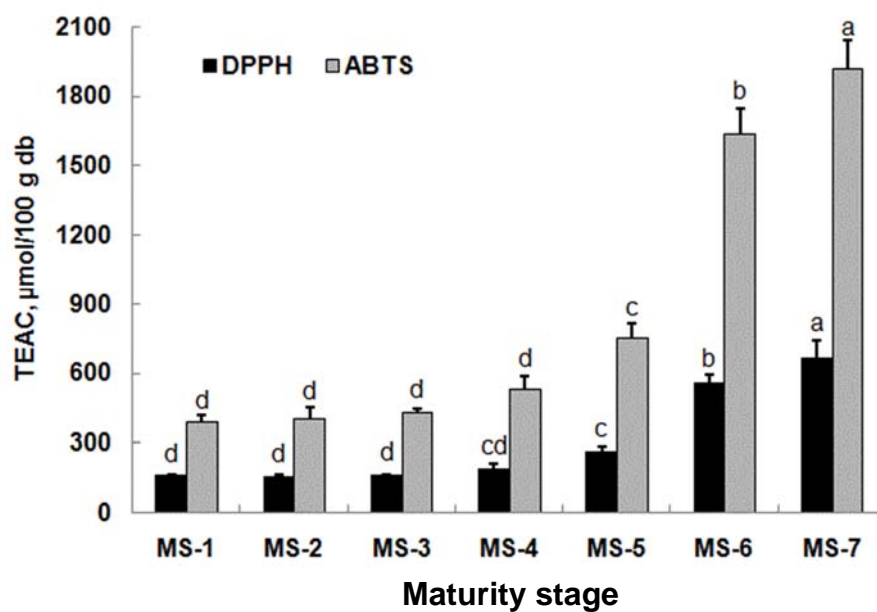


Figure 4. Changes in DPPH and ABTS free radical scavenging activities of mulberry during ripening. MS, maturity stage; db, dry basis; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity. Bars represent means \pm standard deviations ($n=3$). Different letters (a-d) above the bars within each group of DPPH and ABTS indicate significantly difference by Tukey's test at $P<0.05$.

2. 4. 결론

본 연구에서는 유통과 저장에 취약한 오디의 단점을 극복하고, 부가가치를 증대시키기 위하여 7단계 성숙도에 따른 오디의 이화학 특성과 산화방지 활성을 조사하여 오디의 성숙 정도에 따른 잠재적 활용 가능성을 탐색하였다. 성숙도가 증가할수록, 오디의 이화학 특성은 후반기에 극적으로 변화하였다. 미숙 오디는 완숙 오디에 비하여 pH가 낮고, 산도가 높았으며, 경도가 높아 저장성 측면에서 이점이 있었다. 완숙 오디는 미숙 오디에 비해 총 polyphenol과 anthocyanin이 많아 산화방지 활성이 높았다. 미숙 오디는 영양학적 측면에서 조단백질, 조지방, 조섬유, 무기질이 많았으며, 기능성 측면에서는 GABA, 아미노산, 토코페롤, phenolic acid, flavonol 함량이 높았다. 여러 측면에서 볼 때, 완숙 오디뿐만 아니라 미숙 오디 또한 기능성 식품으로서의 잠재적인 활용 가능성이 있다고 판단한다.

제 3 장

성숙도에 따른 오디추출물의

in vitro 생리 활성과 기능 성분 분석

3. 1. 서론

최근 만성 질병에 대한 관심이 높아지면서, 질병의 치료와 예방에 효과가 있는 기능성 식품 연구가 활발해지고 있다. 만성 질병의 하나인 당뇨병은 포도당 항상성에 문제를 일으키는 질병으로 많은 합병증을 유발한다. 최근에는 당뇨병 치료를 식후 혈당 지수의 개선에 초점에 맞춰 수행하는 추세이다(American Diabetes Association, 2001; Bastyr 등, 2000).

현재 식후 탄수화물의 소화 흡수를 지연시킴으로써 갑작스런 혈당 상승을 방지하는 경구용 혈당 강하제인 아카보스는 α -glucosidase 효소 활성부위에 경쟁적으로 결합하여 비가역적으로 활성을 억제시키는 작용을 한다(Reaven 등, 1990). 그러나 아카보스 혹은 메트포민과 같은 계통의 경구용 혈당 강하제는 탄수화물의 소화불량을 일으켜 복부 팽만, 구토 등의 부작용을 일으키므로, 부작용의 가능성이 적은 천연물로부터 얻을 수 있는 방법들을 모색하고 있는 추세이다(Park, 2007). 특히 식물 유래 페놀 화합물이 α -glucosidase와 α -amylase 등의 소화 효소에 효과가 있다는 보고들이 증가하고 있는데, 코코아(Gu 등, 2011), 유색 곡물(Yao 등, 2010), 차의 polyphenol 분획물(Wongsa 등, 2012)이 이러한 소화 효소를 억제한다는 연구가 있다. McDoughall 등(2008)과 Podsedek 등(2014)은 베리에 많이 함유되어 있는 phenolic acid, flavonol, anthocyanin, ellagitannin, proanthocyanidin 등의 polyphenol이 α -glucosidase, α -amylase, 췌장 lipase의 효소

활성을 억제한다고 하였고, Benalla 등(2010)은 블루베리에 풍부한 anthocyanin이 효과적인 α -glucosidase 억제제라고 보고하였다. 더욱이, Son과 Choi(2013)는 4가지 베리(오디, 블루베리, 딸기, 복분자) 와인 중 오디 와인이 α -glucosidase 억제능이 가장 높았으며, quercetin과 그 유도체가 가장 크게 기여한다고 보고하였다.

Wang 등(2013)은 오디 추출물의 당뇨 억제와 산화방지 효과를 보고하였는데, 오디 추출물(에탄올, 헥세인, 다이클로로메테인, 아세트산에틸, 뷰탄올, 물 분획물) 중 아세트산에틸 분획물이 아카보스와 같은 α -glucosidase 50% 억제능을 보였고, 동물실험(쥐)에서도 그 효과가 나타났다고 밝혔다. 오디에 함유되어 있는 chlorogenic acid와 rutin은 아세트산에틸 분획물에 풍부하다(Zhang 등, 2008). Yang 등(2016)과 Lin과 Lay(2013) 등은 오디에 taxifolin과 scopoletin이 검출되었다고 보고하였다. Coumarin 유도체의 하나인 scopoletin은 소염작용과 산화방지 효과와 더불어 만성 알코올로 유도된 쥐에서 인슐린 내성 개선과 산화방지 효소의 유전자 발현을 증가시키는 생리 활성이 보고되었다(Lee 등, 2015). Chlorogenic acid는 식물유래 2차 대사산물인 phenolic acid의 하나로, 산화방지, 지방질 이상 개선, 혈당 저하 등의 생리효과가 있다고 알려져 있다(Santos 등, 2006; Ong 등, 2013). 특히 chlorogenic acid는 포도당과 지방질 대사에 관여하며, AMPK를 활성화시켜 GLUT4가 세포막 사이에서 원형질막으로의 이동을 야기하여 당 수송능력을 증가시키는 thiazolidinedione계 경구용 혈당 치료제와 같은 역할을 보이고(Kruth-Kraczek 등, 1999), 간에서

당 생성과 지방질 생성을 억제하는 효과가 보고되었다(Meng 등, 2013). Flavonoid의 하나인 taxifolin은 항암, 산화방지, 염증억제 효과가 탁월하다고 알려져 있으며, 당뇨를 유발한 쥐에서 산화적 스트레스와 세포괴사를 저해하여 당뇨병 심장질환의 증상을 개선시키는 효과가 나타난다는 보고가 있다(Sun 등, 2014). 여러 flavonoid 중 morin hydrate가 IAPP에 영향을 주어 amyloid 형성과 amyloid 섬유의 분해에 탁월했으며, 이는 제 2형 당뇨 증상 완화에 효과를 나타낸다는 보고가 있다(Noor 등, 2011). 또한, 오디 추출물이 Raw264.7 macrophage 세포와 장 조직에서 염증 및 종양억제 효과가 있었으며, LPS로 유도된 Raw264.7 macrophage 세포에서 각 추출물이 농도(50–200 ug/mL) 의존적으로 산화질소(II) 생성 억제 효과가 있는데, 이 중에서 다이클로로메테인과 아세트산에틸 추출물이 뷰탄올과 물 추출물에 비해 효과가 컸음이 밝혀졌다(Quian 등, 2015). 오디 추출물이 고지혈증 동물(쥐) 모델에서 염증 관련 효소 발현 억제와 혈액 중 총 콜레스테롤 감소를 통해서 이상지방질혈증 개선 효과가 있음이 밝혀졌다(Park 등, 2014).

지금까지 살펴보았듯이, 오디에 함유된 여러 파이토케미컬이 생리 활성에 효과가 있으며, 특히 anthocyanin 혹은 phenolic acid, quercetin 등과 같은 nonanthocyanin 분획물이 크게 기여하는 것으로 나타났다. 하지만, 생리 활성 효과와 기능 성분에 대한 보고는 대부분 완숙 오디를 조사한 연구였으며, 미숙 오디에 관한 연구는 미미하다.

본 연구에서는 기능성 식품 소재로서 완숙 오디뿐만 아니라 미숙 오디의 잠재적 활용 가능성을 탐색해 보고자 하였다. 이를 위하여, 성숙도에 따른 시기별 오디를 7단계로 세분하여 총 cyanide, 지방산 조성, 토코페롤 함량을 분석하였다. 그리고 오디 에탄올 추출물, nonanthocyanin, anthocyanin 분획물의 생리 활성을 알아보기 위하여 염증을 유도한 Raw264.7 세포의 산화질소(II) 생성과 HepG2 세포에서 hexokinase 활성, α -glucosidase 억제 능력을 분석하고, LC-ESI-MS를 이용하여 생리 활성에 관여하는 기능 성분의 구체적인 분석을 수행하였다.

3. 2. 실험재료와 방법

3. 2. 1. 실험재료

본 실험에 사용한 시료는 2.2.1 실험재료에서 기술한 바와 같은 7단계 성숙 시기별 냉동 건조 분말 오디를 -22°C 에서 냉동 보관하며 사용하였다.

3. 2. 2. 총 cyanide 분석

약 0.3 g의 시료에 0.1 M 인산(Samchun Pure Chemical Co., Seoul, Korea) 10 mL를 가하여 격렬히 진탕하고, 4°C 에서 원심분리($1900\times g$)하였다. 잔여물에 위 과정을 반복하여 상층액을 부피플라스크에 넣어 20 mL까지 0.1 M 인산으로 채웠다. 이 추출액 1

mL를 취하여 4 M 황산(Samchun Pure Chemical Co.) 1 mL를 가하여 100℃에서 50분간 가열하였고, 찬물에 냉각시킨 후 3.6 M 수산화소듐(Samchun Pure Chemical Co.) 2.5 mL로 10분간 중화시켰다. 이 용액 100 μ L를 취하여 0.2 M 인산완충용액(pH 6.0) 700 μ L, 0.5%(w/v) chloramine-T (Sigma-Aldrich Co.) 용액 40 μ L를 가한 후 5분간 반응시켰다. 이 후 barbituric acid/pyridine 용액 160 μ L를 첨가한 후 60분간 상온에서 반응시켜 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이온크로마토그래피용 cyanide 표준품(Sigma-Aldrich Co.)을 0.2 M 수산화소듐으로 희석하여 보정선을 작성하였다.

3. 2. 3. 시료 전처리

약 1.5–2.0 g의 냉동 건조 분말 오디에 노말헥세인(Fisher Scientific Korea Ltd.) 20 mL를 가하고 격렬히 진탕하여 5분간 1,717×g로 원심분리한 후 헥세인층을 회수하였다. 이 과정을 2번 더 반복하여 헥세인층을 모아 농축한 후 지방을 회수하였고, 이 지방 분획물을 지방산과 토코페롤 분석에 사용하였다. 지방을 제거하고 건고한 잔여물에 0.1%(v/v) 염산을 함유한 80%(v/v) 에탄올(pH=2.25) 20 mL를 넣고 진탕한 후 30분 간 초음파 추출하고 40℃ 항온수조에서 1시간 동안 교반하였다. 이 추출액을 5분간 원심분리(1,717×g)한 후 잔여물에 이 과정을 2번 더 반복하여 상층액을 모아 여과하였다. 이 여과액을 농축 건고하여 증류수 또는 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS, Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, USA)에 녹인 것을 총 추출물(MTE)이라 명명하였다. 또한 이 건고물에 2 M 염산을 이용하여 pH 3.0으로 조정한 증류수 10 mL를 넣어 다음과 같은 방법(Kammerer 등, 2004)으로 분획물을 얻었다. 이 추출물 용액 5 mL에 증류수를 넣어 20 mL로 만들고, 2 M 염산을 이용하여 pH를 1.5로 조정한 후 50 mL 아세트산에틸(Fisher Scientific Korea Ltd.)로 3번 추출하였다. 이 아세트산에틸 추출물을 농축 건고한 후 물 또는 PBS에 녹여 이 분획물을 nonanthocyanin 분획물(MNAF)이라 명명하였다. 아세트산에틸 추출물을 제외한 나머지 물 층은 SepPak C18 카트리지(Waters)를 이용하여 anthocyanin 분획물(MAF)을 얻었다. MAF의 회수와 MNAF의 HPLC-MS/MS 분석을 위한 고체상추출(solid phase extraction, SPE) 카트리지 정제 순서는 다음과 같다.

먼저 SPE 카트리지는 메탄올(Merck Chemicals) 3 mL와 증류수 10 mL로 활성화하고 세척한 후, 추출물 용액을 넣었다. 첫 번째 단계로, phenolic acid 분획물(F1)은 증류수 10 mL와 0.01% 염산 수용액(pH 2.65) 10 mL로 용출하여 얻고, flavonol 분획물(F2)은 아세트산에틸 20 mL로 용출하여 얻었으며, MAF 분획물은 0.01% 염산을 함유한 메탄올 10 mL로 용출하여 얻었다. MNAF는 첫 번째와 두 번째 단계에서 F1과 F2를 회수하여 농축 건고하였으며, 각각 2% (v/v) 아세트산(Wako Pure Chemical Industries)과 메탄올에 녹여 HPLC-MS/MS 분석에 사용하였다. MAF는 MTE에서 아세트산에틸 층을 제외한 물 층의 용액을 정제하여 세 번째 단계에서 회

수하였으며, 농축 건고하여 증류수 또는 PBS에 녹여서 실험에 사용하였다.

3. 2. 4. 지방산 조성

지방 약 25 mg을 시험관에 취하여 아이소옥탄(Wako Pure Chemical Industries) 1 mL를 넣어 혼합하고, 0.5 N 수산화소듐 메탄올 용액을 1.5 mL 첨가하여 밀봉 후 진탕하였다. 이 시험관을 가열 블록에 넣고 100℃로 5분간 가열한 후 찬물에 냉각하였다. 이후 14% BF_3 (Sigma-Aldrich Co.) 2 mL를 혼합하고 밀봉하여 다시 100℃로 30분간 가열하였다. 상온 냉각 후 아이소옥탄 1 mL를 첨가하고, 포화 염화소듐(Wako Pure Chemical Industries) 용액 5 mL를 넣어 진탕한 후, 상층액을 취하여 GC 분석에 사용하였다. 지방산 분석은 GC-FID (Agilent Technologies 6890N, Agilent Technologies)를 이용하였고, 컬럼은 Supelco 2560 fused-silica capillary 칼럼(100 m×0.25 mm i.d., 0.2 μm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였다. Split ratio는 200:1 이었고, 주입기 온도는 225℃, 검출기 온도는 285℃였다. 오븐 온도는 초기 100℃로 4분 유지하고, 이후 240℃까지 분당 3℃ 속도로 증가시킨 후 15분 유지하였다. 각 지방산의 확인과 정량을 위하여 지방산 혼합표준물질(Supelco 37 component fatty acid methyl esters mixture, Supelco)을 사용하였다.

3. 2. 5. 토코페롤 정량과 확인

지방 약 20 mg을 아이소프로판올(Samchun Pure Chemical Co.)에 녹여 0.2 μm PTFE 여과(Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan) 후 APCI 이온화 방식인 single quadrupole mass spectrometer (6130, Agilent Technologies)가 결합되어 있는 HPLC-DAD (Agilent Technologies)로 분석하였다. 컬럼은 Eclipse XDB-C18 컬럼(5 μm , 4.6 mm \times 150 mm; Agilent Technologies)을 이용하여 95%(v/v) 메탄올 용매를 0.7 mL/min 속도로 다음과 같이 흘려주었다. 초기 38분간 95% 메탄올로 흘려주다가 다음 5분간 100% 메탄올로 높여주고, 다음 0.5분간 95%로 다시 낮춰준 후 1.5분간 같은 비율로 흘려주었다. 컬럼 오븐은 40 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며, 검출 파장은 295 nm였다. 개별 토코페롤의 확인을 위하여 MSD를 이용하였고, 양이온 모드로 분석하였다. 토코페롤 목적 이온은 $(\text{M}+\text{H})^{+}$: m/z 431.3(α -토코페롤), 417.3(γ -토코페롤), 403.3(δ -토코페롤)이었다. 분석 조건은 다음과 같다: full mass scan: m/z 100-620 (0.6 s/scan); vaporizer temperature: 325 $^{\circ}\text{C}$; capillary voltage: 4000 V; corona current: 4 μA ; nebulizing pressure (N_2): 30 psi; gas temperature (N_2): 350 $^{\circ}\text{C}$; gas flow (N_2): 8 L/min; fragmentor: 150 V. 토코페롤 정량과 확인을 위하여 α -토코페롤, γ -토코페롤, δ -토코페롤 표준품을 Sigma-Aldrich Co.에서 구매하여 사용하였다.

3. 2. 6. 세포 배양

본 실험에 사용한 Raw264.7(mouse macrophage)과 HepG2(human hepatoma HepG 2) 세포주는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양 받아, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에 10% (v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco)과 2% HEPES (Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)을 첨가하여 37℃의 5% CO₂ 환경의 배양기(MCO-18AIC, Electronic Biomedical Co. Ltd., Sanyo, Sakata, Japan)로 배양하였다. 세포가 80% 정도 증식하면 scraper 또는 트립신(Gibco)을 이용하여 계대 배양하였다.

3. 2. 7. 세포 독성

MTE, MNAF, MAF의 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 방법(Mosmann, 1983)에 따라 측정하였다. 96-well, flat-bottom plate에 1×10^4 또는 2×10^4 cells/well 농도로 Raw264.7과 HepG2 세포주를 분주하고 같은 조건의 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 다양한 농도의 시료를 함유한 무혈청 배지를 100 μ L씩 넣어 다시 24시간 배양하였다. 각 well의 배지를 제거하고 무혈청 배지 100 μ L와 MTT 용액 10 μ L를 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO, Samchun Pure

Chemical Co.) 100 μ L를 첨가하여 20분 동안 상온에서 formazan을 용해하고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 첨가구와 시료 무첨가구(대조구)의 흡광도를 비교하여 cell viability(%)를 산출하였다.

3. 2. 8. 산화질소(II) 분석

산화질소(II) 생성 억제능은 Izumi 등(1997)의 방법으로 측정하였다. 96-well, flat-bottom plate에 1×10^5 cells/well 농도로 Raw 264.7 세포주를 분주하고, 37℃의 5% CO₂ 환경으로 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고, 다양한 농도의 시료가 함유된 무혈청 배지를 200 μ L씩 넣고 4시간 배양한 후 100 ng/mL 농도의 lipopolysaccharides (LPS 0111: B4, Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하였다. 20시간 후, 세포배양액 100 μ L씩을 취하여 Griess 시약(0.5%(w/v) sulphanilamide (Sigma-Aldrich Co.) 인산(2.5%) 용액과 0.05%(w/v) naphthylethylenediamine dihydrochloride의 1:1 혼합 용액) 100 μ L와 5분간 상온에서 반응시켰다. 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, nitrite 생성률(%)은 시료 무첨가구(대조군) 대비 시료 첨가구로써 산출하였다.

3. 2. 9. Hexokinase 활성 분석

Hexokinase 활성은 hexokinase assay kit에서 제시한 방법(Abcam, 2015)에 따라 분석하였다. 96-well, flat-bottom plate에

1×10^5 cells/well 농도로 HepG2 세포주를 분주하고, 37℃의 5% CO₂ 환경에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고, 다양한 농도의 시료와 positive control인 메트포민(Sigma-Aldrich Co.)이 함유된 25 mM의 고농도 포도당 배지(insulin 5 µg/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 100 µL씩 넣고 다시 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 멸균된 PBS로 세척한 후 assay buffer 200 µL로 세포 용해액을 4℃에서 13,475×g로 원심분리(Smart R17, Micro refrigerated centrifuge, Hanil Science Industrial Co.)하여 상층액을 회수하였다. 상층액을 hexokinase assay kit (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hexokinase 활성(%)은 단백질 함량을 보정한 시료 무첨가구(대조군) 대비 시료 첨가구의 흡광도로 산출하였다. 각 효소 용해액의 단백질 함량은 Bradford 단백질 분석 방법(Bio-rad protein assay, Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 측정하였다.

3. 2. 10. α -Glucosidase 활성 억제

α -Glucosidase 활성 억제능은 Sigma-Aldrich 방법(Kapustka 등, 1981)으로 분석하였다. 4%(w/v) 엿당(Sigma-Aldrich Co.) 용액은 엿당 12 g을 50 mM 아세트산소듐(Sigma-Aldrich Co.) 완충용액 300 mL에 녹여서 조제하였고, α -glucosidase 효소(Sigma-Aldrich Co.) 용액은 1 unit/mL 농도로 냉장(4℃) 보관한 증류수에 녹여 조제하였다. 반응 시약인 o-dianisidine (DIAN) 용액은 DIAN (Sigma-Aldrich Co.) 정제 1개를 증류수 25 mL에 녹였고,

peroxidase/glucose oxidase (PGO) system 용액은 PGO (Sigma-Aldrich Co.) 캡슐 1개를 냉장 증류수 100 mL에 녹여 조제하였다. 첫 번째 단계로 농도 별로 희석한 MNAF과 MAF, 증류수(바탕시험) 20 μ L와 4% 엷당 용액 20 μ L를 섞고 37°C 인큐베이터에서 5분간 두었으며, α -Glucosidase 용액 50 μ L를 넣고 다시 37°C 배양기에서 30분간 방치한 후 4.2%(v/v) 과염소산(Wako pure chemicals Co.) 10 μ L를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 두 번째 단계로, 이 혼합액을 원심분리하여 상층액 50 μ L를 반응 시약(DIAN 용액 50 μ L와 PGO 용액 50 μ L)과 반응시켜 37°C 배양기에서 30분간 방치하였고, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -Glucosidase 활성 억제능(%)은 바탕시험 대비 시료 첨가구로써 산출하였다.

3. 2. 11. 1-Deoxynojirimycin 정량

1-Deoxynojirimycin (Wako Pure Chemicals Co.)은 HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies)와 API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)를 이용하여 electrospray interface 이온화 모드로 정성과 정량 분석하였다. 전처리 과정에서 얻은 MTE를 0.2 μ m 나일론 필터(Chemco Scientific Co.)로 여과 후 LC-MS/MS 분석에 사용하였다. LC 분리 조건으로 XBridgeTM amide column (3.5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm; Waters Co.)을 이용하여 40°C에서 분리하였고, 이동상 용액 A는 0.1% 포름산(LC-MS grade, Fisher Chemical Co.,

Leicestershire, UK), B는 아세트나이트릴이었으며, 다음의 기울기 용매 조건을 이용하여 0.3 mL/min의 유속으로 흘려주었다: 초기 3 분간 B용매를 20%로 유지하고, 이후 5분까지 B용매를 90%로 높여주고, 이후 8분까지 B용매를 90%로 유지한 후 8.5분까지 B용매 20%까지 내리고, 마지막으로 3.5분간 초기상태로 유지해주었다. 시료 주입량은 5 μ L였다. 질량 분석은 양이온 모드로 1-deoxynojirimycin 표준용액(100 μ g/L)을 직접 주입하여 MRM 조건을 설정하였고, 다음과 같은 최적 조건으로 분석하였다: ion spray voltage: 5500 V; ion source gas 1과 gas 2: 60 psi; interface temperature: 500 $^{\circ}$ C; entrance potential energy: 10, 8, 22 V; declustering potential energy: 41 V; collision energy: 17, 21 V; collision cell exit potential energy: 12 V.

3. 2. 12. HPLC-MS/MS 분석

전처리 과정에서 얻은 MTE와 MNAF의 페놀 화합물은 HPLC와 API 4000 triple quadrupole mass spectrometer를 이용하여 electrospray interface 이온화 모드로 정성과 정량 분석하였다. MNAF는 SPE 과정에서 분획한 F1와 F2를 분석하였다. 질량 분석은 음이온 모드로 각각의 표준용액을 직접 주입하여 MRM 조건 (Table 10, 11)을 설정하였고, 다음과 같은 최적 조건으로 분석하였다: ion spray voltage: -4500 V; ion source gas 1과 gas 2: 50 psi; interface temperature: 40 $^{\circ}$ C. HPLC 분석은 Table 12에 나타내었다.

Table 10. MRM conditions of HPLC-MS/MS for analysis of phenolic compounds

	Exact mass	Precursor ion	Product ion	DP	EP	CE	CXP
CGA	354.3	353.0	191.0 85.0	-55	-10	-22 -60	-1 -11
CA	180.2	178.9	134 88.9	-45	-10	-36	-9
PCA	154.1	152.8	128.9 91.0	-45	-10	-22 -34	-5 -15
SGA	198.2	196.9	120.9 152.9	-50	-10	-24 -18	-5
4-HBA	138.1	136.8	95.0 65.0	-55	-10	-20 -42	-5 -7
FA	194.2	192.9	134.0 178.0	-50	-10	-24 -18	-7 -7
CNA	148.2	146.9	103.0 77.0	-50	-10	-16 -32	-5 -3
<i>p</i> -CMA	164.2	162.9	116.9 93.0	-50	-10	-44 -42	-17 -1
GA	170.1	168.9	124.9 79.0	-55	-10	-22 -34	-7 -1
SNA	224.2	222.9	164.0 207.9	-55	-10	-20	-1 -9
VA	168.2	166.8	123.0 107.9	-45	-10	-18 -24	-7 -5

MRM, multi reaction monitoring; DP, declustering potential energy (v); EP, entrance potential energy (v); CE, collision energy (v); CXP, collision cell exit potential energy (v); CGA, chlorogenic acid; CA, caffeic acid; PCA, protocatechuic acid; SGA, syringic acid; 4-HBA, 4-hydroxybenzoic acid; FA, ferulic acid; CAN, cinnamic acid; *p*-CMA, *p*-coumaric acid; GA, gallic acid; SNA, sinapic acid; and VA, vanillic acid.

Table 11. MRM conditions of HPLC-MS/MS for analysis of phenolic compounds (continued)

	Exact mass	Precursor ion	Product ion	DP	EP	CE	CXP
Rutin	610.5	609.2	299.9 271.0	-125	-10	-50 -78	-13 -11
Isoquercetin	464.4	463.0	299.9 270.9	-80	-10	-38 -32	-13 -5
Taxifolin	304.3	302.9	285.0 125.0	-75	-10	-18 -32	-1 -7
Scopoletin	192.2	190.9	175.9 104.9	-50	-10	-22 -34	-9 -15
Morin	302.2	301.0	150.9 148.9	-35	-10	-30 -38	-9 -7

MRM, multi reaction monitoring; DP, declustering potential energy (v); EP, entrance potential energy (v); CE, collision energy (v); and CXP, collision cell exit potential energy (v)

Table 12. Operating conditions of HPLC-DAD-MS for phenolic compounds

Mobile solvent	A: 2% acetic acid (LC-MS grade, Fisher scientific) B: acetonitrile					
Column	Atlantis T3, 3 μ m, 2.1 mm \times 100 mm; Waters					
Guard column	XDB C18, 5 μ m, 4.6 mm \times 12.5 mm; Agilent technologies					
Injection volume	5 μ L					
Column temperature	30 $^{\circ}$ C					
Detector wavelength	254 nm, 360 nm; scan range, 200-600 nm					
Flow rate	0.3 mL/min					
Pump gradient program	Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	95	5	25.0	75	25
	3.0	95	5	30.0	75	25
	5.0	90	10	35.0	70	30
	7.0	90	10	40.0	70	30
	10.0	85	15	45.0	5	95
	13.0	85	15	50.0	5	95
	16.0	80	20	51.0	95	5
	20.0	80	20	55.0	95	5

표준물질로 chlorogenic acid, caffeic acid, protocatechuic acid, syringic acid, 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, gallic acid, sinapic acid, vanillic acid, rutin, isoquercetin, taxifolin, scopoletin, catechin은 Sigma-Aldrich Co.에서, morin은 Wako Pure Chemicals Co.에서 구매하여 사용하였다.

Chlorogenic acid 이성질체와 morin의 재확인을 위하여 HPLC-DAD-ESI-MS (Agilent 1290 infinity Series와 6495 triple quadrupole LC/MS, Agilent Technologies)를 이용하였다. 이동상 용액은 A(1% 포름산)와 B(메탄올)을 이용하여 Table 12와 동일한 LC 조건으로 분석하였다. Mass 분석 조건은 다음과 같다: EM voltage: -100 V; scan range: 100-700; fragmentor: 380 V; cell accelerator voltage: 5 V; gas temperature: 250°C; gas flow: 15 L/min; nebulizer: 45 psi; sheath gas temperature: 350°C; sheath gas flow: 12 L/min; capillary voltage: -3500 V.

3. 2. 13. 통계 분석

실험 결과와 통계처리는 SPSS 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, t-test 또는 일원배치분산분석, 사후검증으로 던칸 시험을 실시하여 실험군 간의 통계적 유의성($P < 0.05$)을 평가하였다.

3. 3. 결과와 고찰

3. 3. 1. 총 cyanide 분석

Table 13에 나타낸 바와 같이 미숙 오디(MS-1-5)의 cyanide 함량은 4.1-7.7 mg/100 g (db)였고, 완숙 오디(MS-6, 7)에서는 검출되지 않았다. 이는 박(2013)이 보고한 아마씨(77.1 mg/100 g), 포도씨(16.1 mg/100 g), 블랙라즈베리씨(7.7 mg/100 g)에 함유된 양보다 낮았다. Cyanide는 많은 식물에 cyanoglucoside 형태로 존재하고 효소에 의해 hydrogen cyanide가 생성되어 독성을 유발하며, 200 mg의 cyanide를 섭취하였을 때 수 분 안에 죽음에 이를 수 있다는 보고가 있다(Biller, 2008). 현재 식품의약품안전처(2016)에서는 살구씨와 복숭아씨에 cyanide가 많이 함유되어 있어 식용을 금지하고 있고, cyanide의 일일최대노출허용량을 체중 1 kg 당 1.2 mg으로 기준을 정하고 있기 때문에 60 kg 체중의 성인 기준으로 일일최대노출허용량을 산출하면 72 mg이 된다. 본 실험의 결과를 미루어 볼 때, 미숙 오디 건조물 1 kg을 섭취하면 최대 77 mg의 cyanide에 노출될 수 있는데, 오디를 하루에 한 사람이 건조물 기준으로 1 kg 이상을 섭취하는 경우는 드물기 때문에 오디 섭취로 인한 cyanide 독성이 나타날 위험은 적다고 판단한다.

Table 13. Changes in total cyanide of mulberry during ripening
(mg/100 g, dry basis)

	Total cyanide
MS-1	5.6±2.8
MS-2	5.6±1.8
MS-3	7.4±3.0
MS-4	7.7±2.5
MS-5	4.1±0.7
MS-6	nd
MS-7	nd

MS, maturity stage; nd, not detected. Values are means ± standard deviations (n=3).

3. 3. 2. 지방산 조성

오디의 지방산 조성은 Table 14에 나타내었다. 오디가 익어감에 따라 지방산 조성에는 큰 변화가 없었다. 오디에 함유된 주요 지방산은 80%가 linoleic acid였고, palmitic acid (8.0–11.0%), oleic acid (4.5–6.0%), stearic acid (3.5–3.9%), eicosenoic acid (1.0–2.3%) 순서로 많았으며, MS-2에서 myristic acid (0.3%)도 미량 검출되었다. 오디(*Morus alba* L.)의 지방산 조성에 대한 연구를 수행한 Yang 등(2010)도 유사한 결과를 보고하였는데, 지방산이 linoleic acid (79.4%), palmitic acid (8.6%), oleic acid (7.5%), stearic acid (4.0%)의 순서로 많았고, α -linolenic acid도 미량(0.61%) 검출되었다고 하였다. 또한 Ercisli 등(2006)도 지방산 비율이 조금 차이는 있으나 위 4개 지방산 순서로 많이 함유되었다고 보고하였으며, myristic acid (1.0%)도 검출되었다고 하였다. 이와 같이 같은 오디 품종에서의 지방산 조성 차이는 서로 다른 지역에서의 생육 환경에 따라 달라질 수 있으나, linoleic acid가 총 지방산의 60% 이상인 것은 모두 일치하였다. Linoleic acid와 linolenic acid는 필수 지방산으로서, 세포막을 구성하며, 프로스타글란딘의 생성과 콜레스테롤 대사에 중추적인 역할을 하고(Wu, 2003), linoleic acid를 섭취한 실험 쥐의 혈중 콜레스테롤이 낮아졌다는 보고(Kadowaki 등, 1993)가 있다.

Table 14. Changes in fatty acid composition of mulberry during ripening (% lipid)

	Myristic acid (C14:0)	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1 c)	Linoleic acid (C18:2 <i>n</i> 6c)	Eicosenoic acid (C20:1 <i>n</i> 9)
MS-1	nd	8.0	3.9	4.5 b	81.4	2.3 a
MS-2	0.3	9.8	3.7	5.5 a	79.3	1.4 b
MS-3	nd	8.1	3.6	5.2 ab	82.0	1.1 b
MS-4	nd	8.3	3.9	5.5 a	81.0	1.4 b
MS-5	nd	8.6	3.6	5.7 a	81.0	1.0 b
MS-6	nd	9.8	3.6	5.9 a	79.4	1.2 b
MS-7	nd	11.0	3.5	6.0 a	78.4	1.1 b

MS, maturity stage; nd, not detected. Values are means (n=2). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Duncan's test at $P<0.05$.

또한, Yang 등(2010)은 고지질혈증을 유도한 쥐에 오디 분말과 함께 고지방식이를 섭취시킨 결과, 혈중 지질이 낮아지는 효과를 보고하였는데, 이는 오디에 풍부한 linoleic acid와 식이섬유가 주요한 역할을 한 것이라고 하였다. 따라서, 오디에 풍부한 linoleic acid는 지질 대사에서 긍정적인 효과를 보일 수 있으며, 특히 지방과 식이섬유가 많은 미숙 오디에서 그 효과가 클 것으로 보인다.

3. 3. 3. 토코페롤 함량

Figure 5에 토코페롤의 HPLC 분석 크로마토그램을 제시하였다. α -토코페롤, γ -토코페롤, δ -토코페롤 표준품 분석 크로마토그램을 보면, δ -, γ -, α -토코페롤 순서로 분리가 되었다. 그리고 오디 지방 시료를 분석한 결과, δ -와 γ -토코페롤과 머무름 시간이 일치하는 피크가 검출되었고, 표준품과 UV 스펙트럼(200-400 nm)을 비교하여 일치하는 결과가 나타났으며, 질량분석기로 target ion인 δ -토코페롤(m/z 403.3)과 γ -토코페롤(m/z 417.3)을 확인할 수 있었다. Table 15에 제시했듯이, δ -토코페롤 함량은 미숙 오디(MS-1-5; 105.4-126.6 mg/100 g lipid)보다 완숙 오디(MS-6, 7; 93.5-96.9 mg/100 g)에 유의적으로($P<0.05$) 낮았고, γ -토코페롤은 유의적인 차이가 없었다. 오디 분말 시료 당 총 토코페롤 함량은 지방 함량이 높은 MS-3, 4, 5(27.3-29.2 mg/100 g (db))가 나머지 시기의 오디(13.1-20.7 mg/100 g)보다 유의적으로($P<0.05$) 높았다.

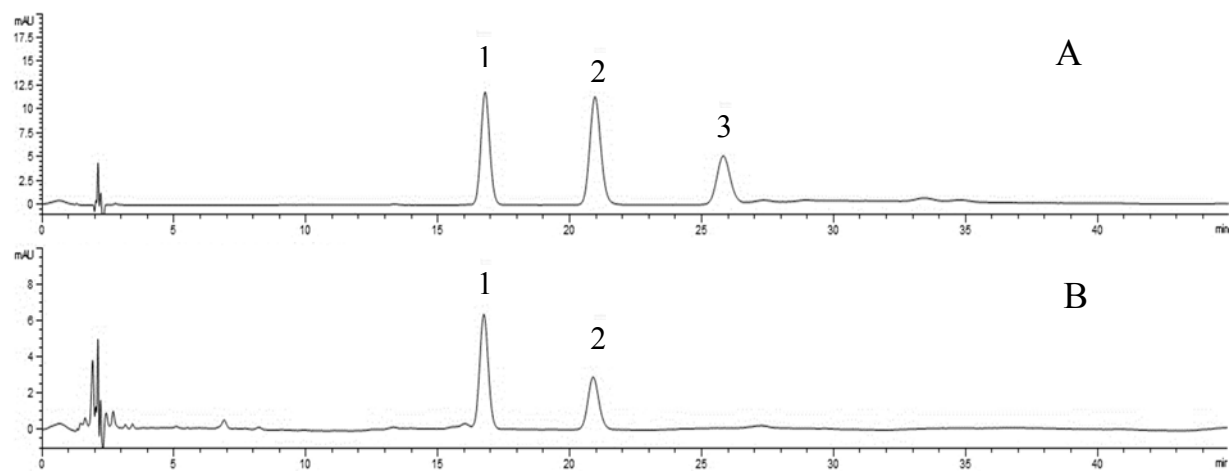


Figure 5. HPLC chromatograms of tocopherol standards (A) and the lipid of mulberry (maturity stage-3) (B) at 295 nm. 1, δ -tocopherol; 2, γ - tocopherol; and 3, α -tocopherol.

Table 15. Changes in tocopherols of mulberry during ripening (mg/100 g lipid)

	δ -Tocopherol	γ -Tocopherol	Total
MS-1	126.6 \pm 19.7 a	70.2 \pm 17.2	196.8 \pm 34.8
MS-2	116.9 \pm 6.2 ab	53.0 \pm 3.8	169.9 \pm 3.9
MS-3	109.6 \pm 5.6 abc	53.1 \pm 8.6	162.6 \pm 14.2
MS-4	105.4 \pm 9.3 bc	55.1 \pm 21.7	160.4 \pm 31.0
MS-5	108.4 \pm 6.5 abc	60.3 \pm 18.5	168.7 \pm 24.7
MS-6	96.9 \pm 1.9 bc	62.6 \pm 3.2	159.5 \pm 4.9
MS-7	93.5 \pm 2.7 c	63.1 \pm 3.7	156.6 \pm 6.3

MS, maturity stage. Values are means \pm standard deviations (n=4). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Duncan's test at $P<0.05$.

Yang 등(2010)은 오디에서 γ -토코페롤(24.5 mg/100 g), δ -토코페롤(7.4 mg/100 g), α -토코페롤(0.4 mg/100 g)이 검출되었다고 보고하였다. 오디에 함유된 토코페롤은 lipophilic 항산화 성분으로 산화방지 활성 효과가 기대된다.

3. 3. 4. 추출물 수율

오디 추출물의 수율은 Table 16에 나타내었다. 오디가 익어감에 따라 MTE와 MAF는 증가하였고, MNAF는 감소하였다. 익는 과정 동안 증가하는 당과 anthocyanin이 수율에 영향을 주었다고 본다.

3. 3. 5. 세포 독성

성숙도에 따른 MTE, MNAF, MAF는 모두 50–400 μ g/mL의 농도에서 Raw264.7과 HepG2 세포 생존율이 약 80% 이상으로 모든 추출물이 세포에 독성을 나타내지 않았다(Figure 6과 7).

Table 16. Changes in yield of mulberry extract during ripening (% dry basis)

	Total extract	Nonanthocyanin fraction	Anthocyanin fraction
MS-1	26.1±1.9 e	5.2±0.5 a	-
MS-2	27.9±4.3 de	5.9±0.6 a	-
MS-3	32.4±0.8 d	6.2±1.6 a	-
MS-4	40.9±3.5 c	5.4±0.8 a	3.1±1.2 a
MS-5	51.7±1.8 b	4.7±0.7 a	3.5±1.2 a
MS-6	74.2±2.3 a	2.8±0.5 b	4.2±0.5 a
MS-7	76.2±2.2 a	2.9±0.6 b	4.9±0.6 a

MS, maturity stage. Values are means ± standard deviations (n=3). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Duncan's test at P<0.05.

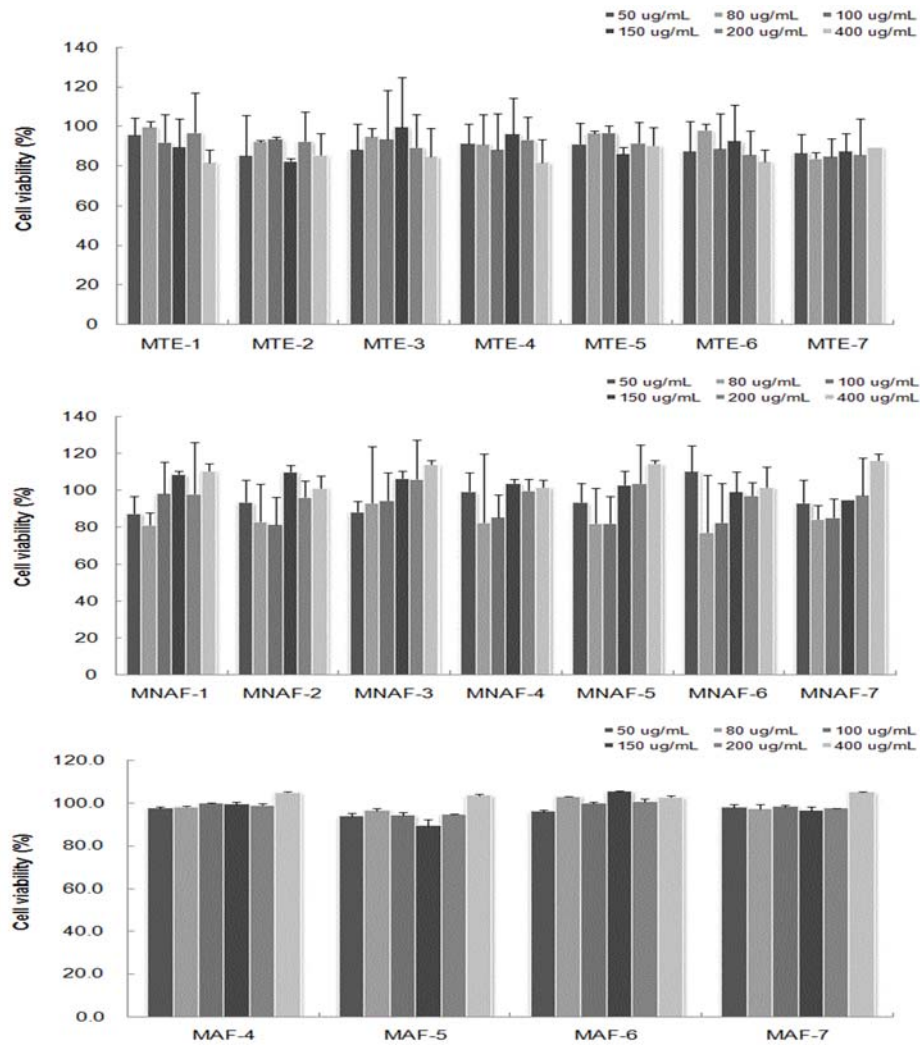


Figure 6. Effect of mulberry extracts on cell viability of Raw264.7 cells. Untreated control cells were set at 100. MNAF, mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage 1-7); MAF, mulberry anthocyanin fraction (maturity stage 4-7). Bars represent means \pm standard deviations (n=3).

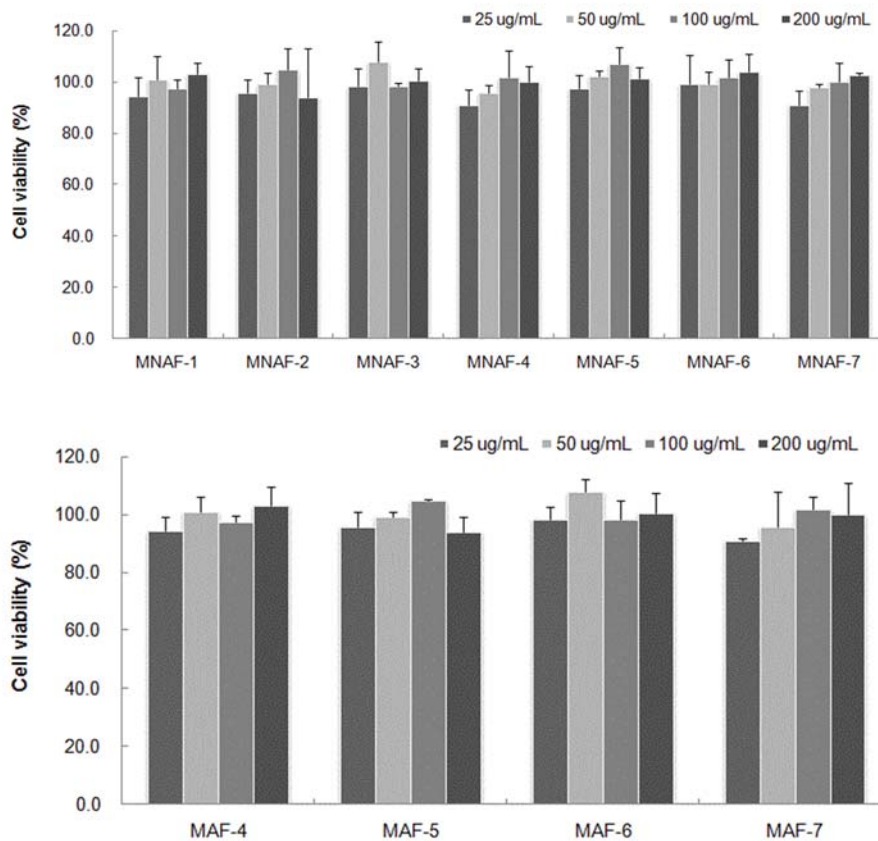


Figure 7. Effect of mulberry extracts on cell viability of HepG2 cells. Untreated control cells were set at 100. MNAF, mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage 1-7); MAF, mulberry anthocyanin fraction (maturity stage 4-7). Bars represent means \pm standard deviations (n=3).

3. 3. 6. 산화질소(II)

산화질소(II)는 염증 발달과 관련이 있으며(Mantovani 등, 2008), LPS 자극으로 유도한 Raw264.7 macrophage 세포에 오디 추출물을 처리했을 때의 산화질소(II) 생성량을 대조군에 대비(%)하여 Figure 8에 나타내었다. MTE를 50-400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 결과, 산화질소(II) 생성율은 MS-3과 5를 제외한 나머지 성숙 시기 MTE의 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군 대비 억제효과가 나타났으나, 농도의존적 경향과 성숙도에 따른 차이는 보이지 않았다. MNAF는 MS-2와 6을 제외하고 80 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이상에서 산화질소(II) 생성율이 대조군과 비교하여 낮았고, 농도의존적으로 산화질소(II) 생성이 억제되는 경향이었다. MAF의 경우 50-200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 결과, MS-4와 5는 모든 농도에서 대조군 대비 산화질소(II) 생성율이 낮았으나, MS-6은 50과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도만 억제효과가 있었고, MS-7은 모든 농도에서 대조군과 차이가 없었다. Quing 등(2015)은 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 오디 추출물을 처리한 Raw264.7 macrophage 세포에서 산화질소(II) 생성이 억제됨을 관찰하였고, 정(2015)은 블랙라즈베리, 블랙베리, 복분자의 anthocyanin 분획물이 5-20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 산화질소(II) 생성이 억제되었다고 보고하였다.

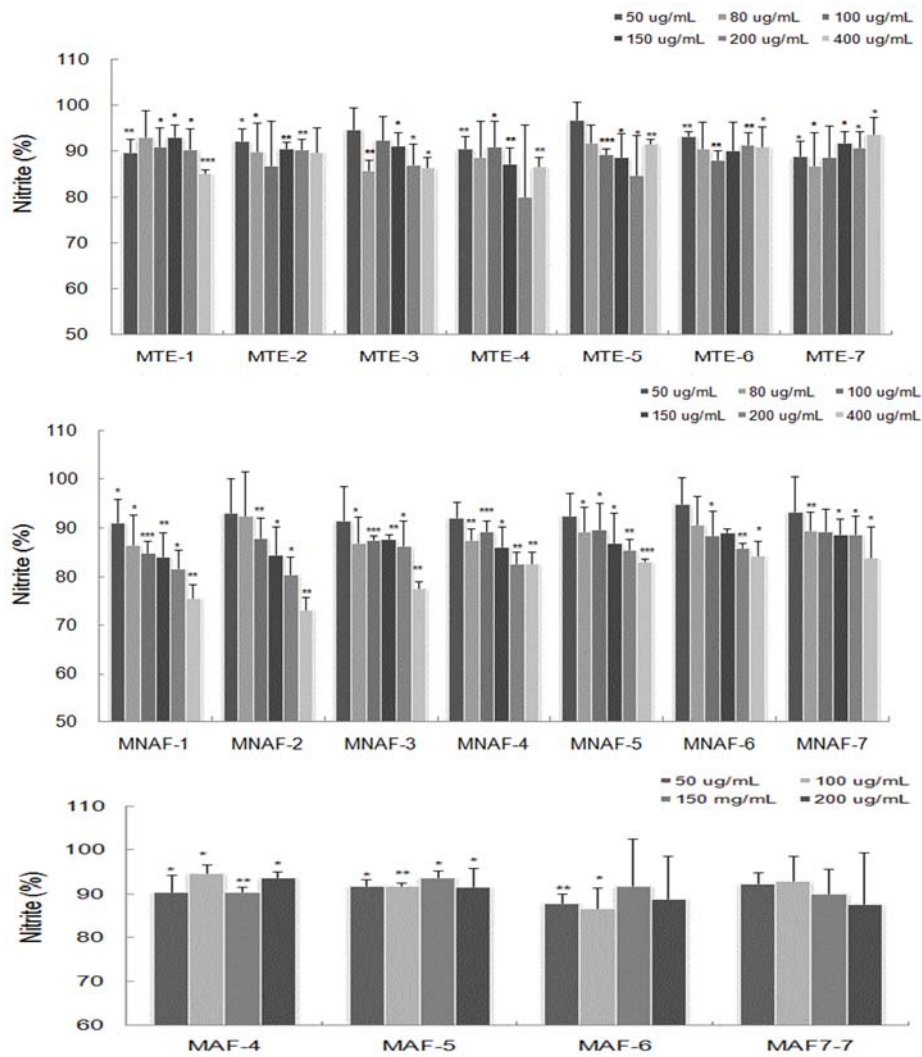


Figure 8. Nitric oxide production of Raw264.7 cells treated with mulberry total extract (MTE, maturity stage 1-7), nonanthocyanin fraction (MNAF, maturity stage 1-7), and anthocyanin fraction (MAF, maturity stage 4-7). Untreated control cells were set at 100. Bars represent means \pm standard deviations (n=3). Statistical significance is based on the difference when compared with the cells without treating extracts (* P <0.05, ** P <0.01, and *** P <0.001).

또한, Cuevas-Rodriguez 등(2010)은 블랙베리 추출물의 산화방지 활성과 산화질소(II) 생성 억제에 polyphenol과 유의적인 상관성이 있다고 하였다. 따라서 오디 추출물과 분획물에 풍부하게 함유된 페놀 화합물이 LPS 자극으로 유도한 Raw264.7 macrophage 세포의 염증 억제 효과에 기여했다고 본다.

3. 3. 7. Hexokinase 활성

성숙도에 따른 오디의 MNAF와 MAF가 HepG2 세포의 hexokinase 활성에 미치는 영향을 시험한 결과, 25 mM 포도당과 인슐린(5 $\mu\text{g/mL}$)이 함유된 배지에서의 hexokinase 활성은 대조군에 비해 MS-5의 MNAF가 유의적으로($P<0.05$) 높았으며, MAF는 다소 낮은 활성을 보였다(Figure 9). MNAF는 대조군에 비해 완숙 오디(MS-6, 7; 96.9, 98%)보다 미숙 오디(MS-1-5; 101.9-114.8%)가 hexokinase 활성이 컸으며, MAF(MS-4-7; 86.0-99.2)보다 높았다. Hexokinase는 포유류를 비롯하여 많은 유기체의 포도당 대사에 관여하는 효소로서, 해당과정에서 포도당을 비롯한 육탄당을 인산화하여 hexokinase phosphate를 생성하도록 한다. Hexokinase의 이성질체는 4개가 있는데, 이 중 제 4형 hexokinase는 glucokinase라고도 하며, 동물과 사람의 간 세포에서 포도당을 인산화하고 포도당-6-phosphate를 생성하도록 하여 해당과정을 촉진시킨다. 많은 수의 제2형 당뇨병 환자에서 glucokinase의 활성이 낮아져 있다는 것이 알려져 있다(Caro 등, 1995).

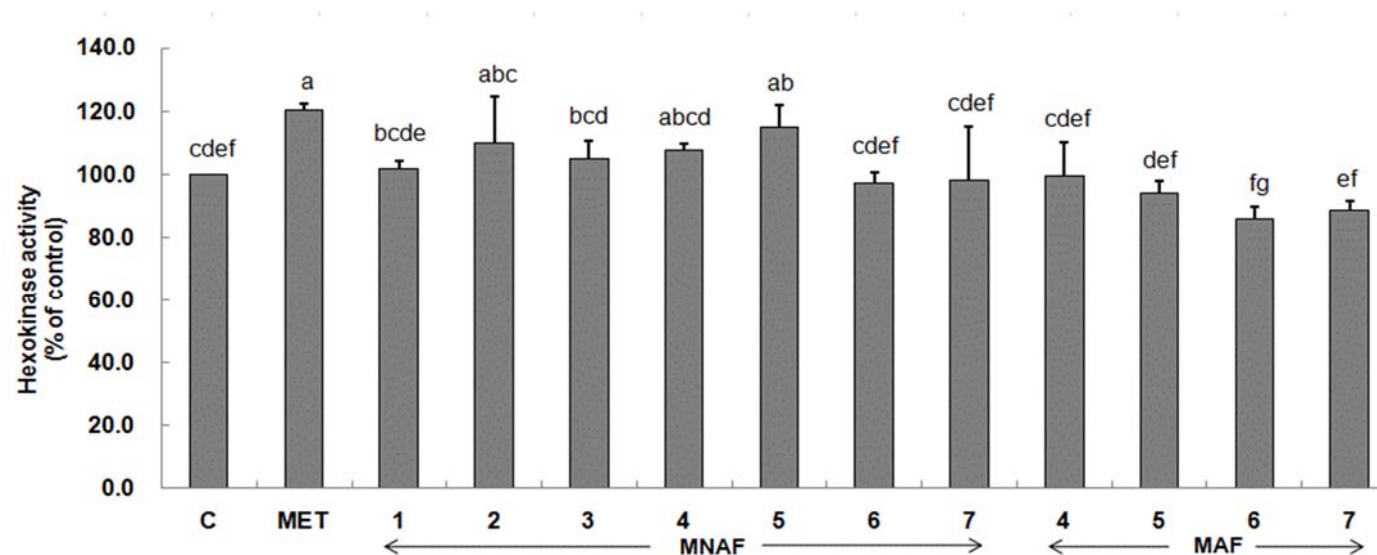


Figure 9. Effect of mulberry extracts on hexokinase activity of HepG2 cells. C, control; MET, metformin; MNAF, mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage 1-7); and MAF, mulberry anthocyanin fraction (maturity stage 4-7). Bars represent means \pm standard deviations (n=3). Different letters (a-g) above the bars indicate significantly different by Duncan's test at $P < 0.05$.

따라서, hexokinase의 활성을 높이면 해당과정을 촉진시키고 혈중 포도당 농도를 억제하여 당뇨병의 증상 완화에 효과가 있다고 볼 수 있다. 메트포민은 경구용 당뇨병 치료제로서, 간에서 포도당 신생합성을 억제하여 고혈당 상태에서 혈당을 낮추는 효과가 있다 (Kirpichnikov 등, 2002). 메트포민(120.3%)의 hexokinase 활성은 대조군에 비해 유의적으로($P<0.05$) 높았고, MS-4와 5의 MNAF(107.8, 114.8%)의 이 효소 활성은 메트포민 것보다는 다소 낮았으나 대조군에 비해 높았으므로, 오디 MNAF는 hexokinase의 활성을 증가시켜 혈당을 낮추는데 기여할 가능성이 있다.

3. 3. 8. α -Glucosidase 활성 억제

Figure 10에 제시한 α -glucosidase를 50% 억제하는데 필요한 각 분획물의 농도를 보면, MNAF의 경우에 193-477 $\mu\text{g/mL}$ 범위로 오디가 익어감에 따라 높아졌고, MAF의 경우는 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서 277 $\mu\text{g/mL}$ 로 낮아졌다. 따라서, 오디가 익어갈수록 α -glucosidase 억제능은 MNAF의 경우는 낮아지고, MAF의 경우는 높아짐을 알 수 있다. 특히, 아카보스(468 $\mu\text{g/mL}$)와 비교하였을 때, 완숙 오디(MS-6, 7)의 MNAF와 미숙 오디(MS-4, 5)의 MAF를 제외한 모든 분획이 아카보스보다 억제능이 유의적으로($P<0.05$) 우수하였다. α -Glucosidase는 소장 점막세포에서 분비되는 효소의 하나로서 엿당, 설탕, 젖당 등의 이당류를 분해하여 당 흡수에 중요한 역할을 한다. 따라서 α -glucosidase의 활성을 억제하면 식후 급격한 혈당 상승을 억제하여 당뇨병 증상을 개선할 수 있다.

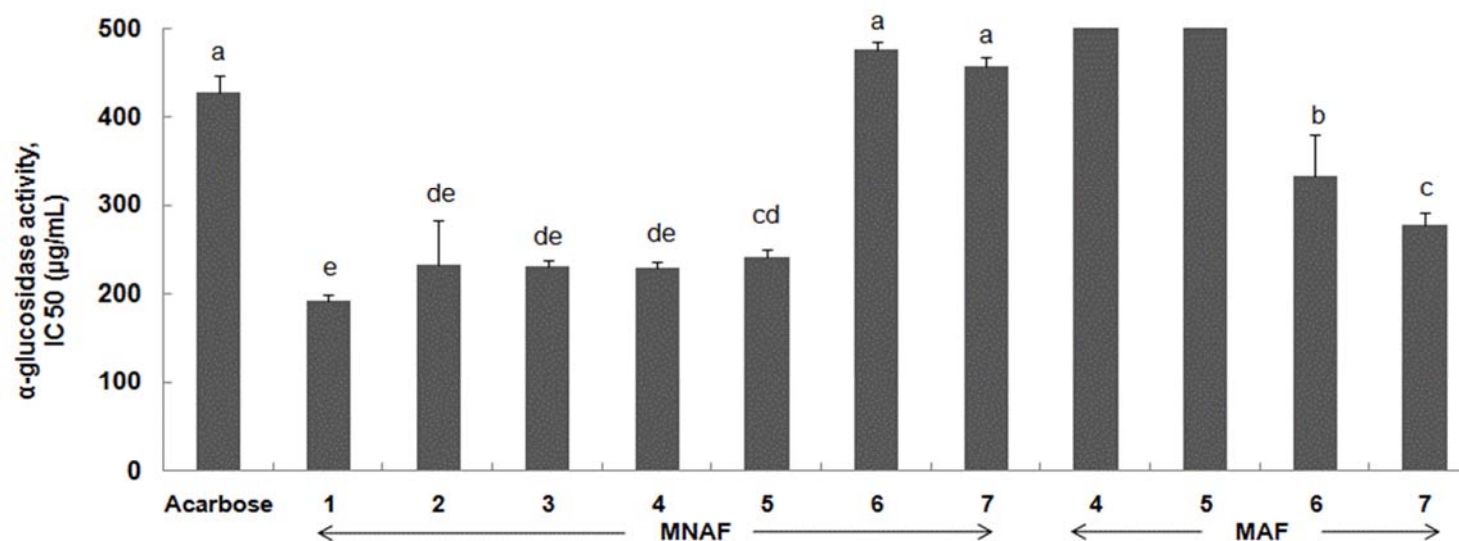


Figure 10. Effect of mulberry extracts on α -glucosidase activity. IC 50 values ($\mu\text{g/mL}$) of compounds represent the concentrations that caused 50% enzyme activity loss. MNAF, mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage 1-7); and MAF, mulberry anthocyanin fraction (maturity stage 4-7). IC 50 of MAF 4 and 5 are more than 500 $\mu\text{g/mL}$. Bars represent means \pm standard deviations ($n=3$). Different letters (a-e) above the bars indicate significantly different by Duncan's test at $P<0.05$.

식후 탄수화물의 소화 흡수를 지연시킴으로써 식후 갑작스런 혈당 상승을 방지하는 경구용 혈당 강하제인 아카보스는 α -glucosidase 효소 활성부위에 경쟁적으로 결합하여 비가역적으로 활성을 억제시키는 작용을 한다(Reaven 등, 1990). 따라서, 미숙 오디에는 MNAF에 풍부한 nonanthocyanin 페놀화합물이, 완숙 오디에는 anthocyanin이 혈당 강하 효과를 나타낼 수 있는 성분이라 보이며, 미숙 오디(MS-1-4)의 MNAF는 완숙 오디(MS-6, 7)의 MAF보다 α -glucosidase 억제능이 다소 우수한 것으로 보인다. 본 연구의 결과를 통하여 오디 분획물에 많이 함유되어 있는 polyphenol이 α -glucosidase의 활성 부위에 복합적으로 작용하여 효소 작용을 억제시키는 역할을 하는 것으로 추정할 수 있다. Wang 등(2013)은 오디 추출물의 당뇨억제와 산화방지 효과를 보고하였는데, 오디 추출물(에탄올, 헥세인, 다이클로로메테인, 아세트산에틸, 뷰탄올, 물 분획물) 중 아세트산에틸 분획물이 아카보스와 같은 α -glucosidase 50% 억제능을 보였고, 동물실험(쥐)에서도 그 효과가 나타났다고 밝혔다. 또한 뽕잎에서 얻은 아세트산에틸 추출물(171 $\mu\text{g/mL}$)이 물 추출물(533 $\mu\text{g/mL}$)보다 3배 더 높은 α -glucosidase 50% 억제능을 나타내어 아카보스(117 $\mu\text{g/mL}$)와 유사한 결과를 보였다는 연구(Yang 등, 2012)와 같은 추출물에서 얻은 다이클로로메테인(214 $\mu\text{g/mL}$)과 아세트산에틸(225 $\mu\text{g/mL}$) 분획물이 아카보스(534 $\mu\text{g/mL}$)보다 2배 더 높은 α -glucosidase 50% 억제능을 보였다는 연구(Park 등, 2009)를 볼 때, 페놀 화합물이 풍부하게 함유되어 있는 아세트산에틸 분획물이 더 큰 효소

억제능을 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있고, 이는 아세트산에틸 분획물에 함유된 nonanthocyanin이 풍부하게 함유되어 있는 미숙 오디에서 그 효과가 크다는 본 연구와 일치하는 결과였다.

3. 3. 9. 1-Deoxynojirimycin

1-Deoxynojirimycin은 이미노당의 하나로, α -glucosidase를 억제하여 혈중 포도당 농도를 낮추는 효과가 있다(Kong 등, 2008). Rodriguez-Sanchez 등(2011)은 오디에 함유된 1-deoxynojirimycin이 잎에서는 4-268 mg/100 g (db), 가지에서는 27-475 mg/100 g, 과일에서는 11-27 mg/100 g의 범위로 검출되었다고 보고하였다. 한편, Song 등(2009)은 1-deoxynojirimycin이 12개 품종의 오디즙에 34-346 mg/L 함유되어 있었고, 건조 오디에서는 검출되지 않았다고 보고하였다. 발색단이 없는 1-deoxynojirimycin 같은 화합물은 질량분석기를 이용하여 용이하게 검출할 수 있다. 특히 LC-MS/MS는 MRM 모드를 이용하여 1-deoxynojirimycin을 민감하고 선택적으로 분석할 수 있어서(Nuengchamnong 등, 2007), 본 연구에서 오디에 함유된 1-deoxynojirimycin을 성공적으로 검출할 수 있었다. 1-Deoxynojirimycin의 MRM transition은 m/z 164.2(precursor 이온)/ 146.1, 110.1, 128.2(product 이온)으로, 표준물질과 시료의 추출 이온 크로마토그램에서 서로 일치하는 이온 세기 비율을 보였다(Figure 11). 1-Deoxynojirimycin의 정량은 m/z 146.1 이온의 세기로 산출하였다.

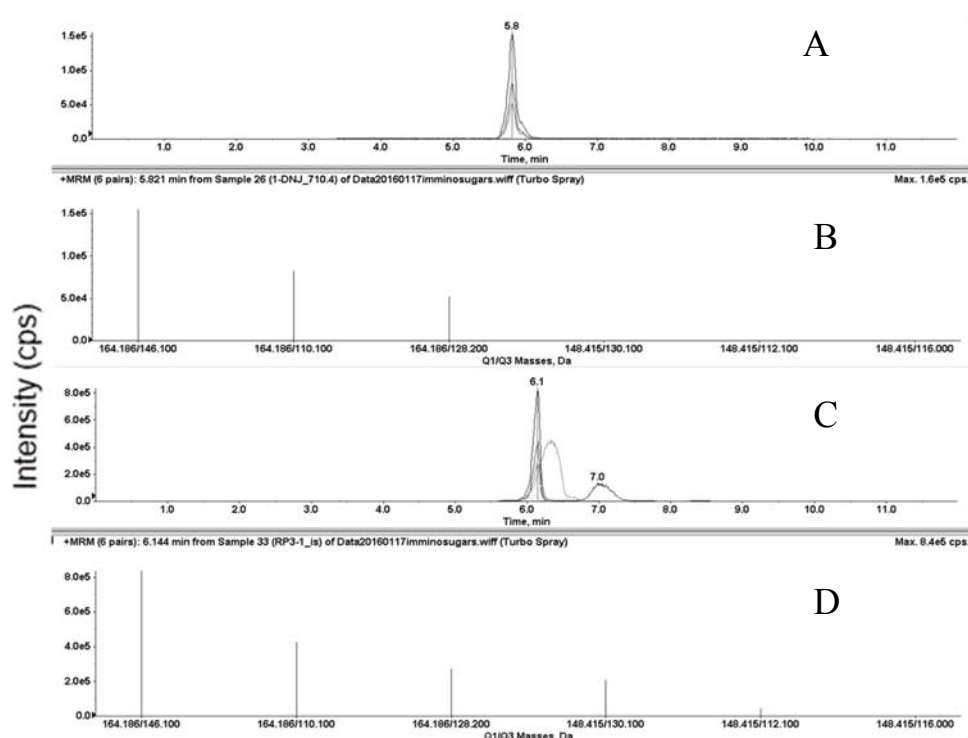


Figure 11. Extracted ion chromatograms and MRM transition of 1-deoxynojirimycin (A and B) and mulberry total extract (maturity stage-3) (C and D).

Table 17에서 보는 바와 같이 오디 총 추출물의 1-deoxynojirimycin 함량은 미숙 오디(MS-1-5, 5.1-9.0 mg/100 g)가 완숙 오디(MS-6, 7, 1.7-1.9 mg/100 g)보다 2배 이상 높았다. Kimura 등(2007)은 12 mg 이상의 1-deoxynojirimycin이 함유된 빵잎 분말을 설탕 50 g과 함께 사람에게 섭취시켰을 때 식후에 혈당 상승이 급격하게 억제되었다고 보고하였다. 따라서, 완숙 오디에 비해 미숙 오디에 더 많이 함유된 1-deoxynojirimycin이 α -glucosidase 억제능에 더 기여할 가능성이 있다고 본다.

3. 3. 10. 오디 추출물의 HPLC-MS/MS 분석

제2장에서 HPLC-DAD를 이용하여 분말 오디의 페놀 화합물을 분석하였으나, 검출된 성분에 대한 명확한 확인과 기존에 보고된 오디의 여러 파이토케미컬의 변화를 분석하는 데는 한계가 있었다. 따라서, 오디에 함유된 페놀 화합물의 정성과 정량 분석을 수행하고자, HPLC-MS/MS를 이용하였다. MRM 모드로 phenolic acid 11종과 flavonol 5종 등 화합물의 최적 분석 조건을 확립하였고, MTE와 MNAF에 적용하여 분석하였다. Phenolic acid 11종의 표준물질과 MNAF를 분석한 총 이온 크로마토그램을 보면(Figure 12), 5-15분 사이에 높은 피크들이 관찰되었으며, 6.6과 10.0, 12.8분에 높게 나타난 성분들이 모두 chlorogenic acid와 같은 MRM transition인 m/z 353(precursor 이온)/ 191과 85(product 이온)로 나타났다.

Table 17. Changes in 1-deoxynojirimycin of mulberry during ripening (mg/100 g mulberry total extract)

	1-Deoxynojirimycin
MS-1	9.0 a
MS-2	8.9 a
MS-3	7.9 b
MS-4	7.0 c
MS-5	5.1 d
MS-6	1.9 e
MS-7	1.7 e

MS, maturity stage. Values are means (n=2). Values with different lower case letters are significantly different by Duncan's test at $P<0.05$.

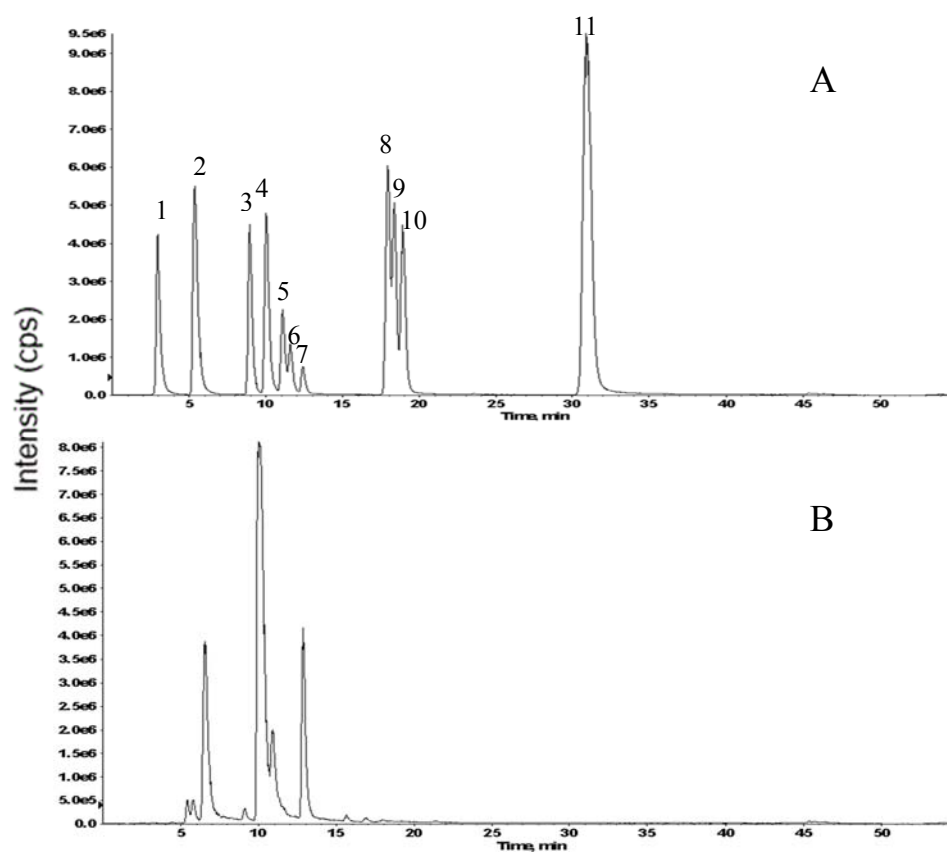


Figure 12. Total ion chromatograms of phenolic acid standards (A) and mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage-3) (B). 1, gallic acid; 2, protocatechuic acid; 3, 4-hydroxybenzoic acid; 4, chlorogenic acid; 5, vanillic acid; 6, caffeic acid; 7, syringic acid; 8, ferulic acid; 9, sinapic acid; 10, p-coumaric acid; 11, cinnamic acid.

Chlorogenic acid는 caffeoylquinic acid의 하나로서, 이것의 이성질체는 neochlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)와 cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)가 있다. 오디에 함유된 chlorogenic acid에 대하여, Zhang 등(2008)은 chlorogenic acid와 cryptochlorogenic acid가, Oki 등(2006)은 neochlorogenic acid와 cryptochlorogenic acid 등 각 2종만 검출되었다고 하였고, Isabelle 등(2008)과 Lee 등(2016)은 3종 모두가 검출되었다고 하였다. 따라서, 본 연구의 총 이온 크로마토그램에서 관찰된 3개 성분은 모두 chlorogenic acid와 이것의 이성질체로 판단된다. HPLC-DAD-MS로 분석한 결과, Figure 13에서 보듯이 3개의 피크는 모두 m/z 353으로 질량 스펙트럼이 일치하였으며, 기존의 연구를 바탕으로 이 피크들은 chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid로 확인되었다. Table 18과 19를 보면, MTE와 MNAF에 함유된 phenolic acid는 chlorogenic acid가 대부분이었고, 각각 3,367-191 mg/100 g과 12,813-2,251 mg/100 g 함유되어 있었으며 그 함량이 오디가 익어감에 따라 급격히 낮아졌다. Chlorogenic acid 중 neochlorogenic acid가 가장 많았으며, 이는 오디에 함유된 chlorogenic acid 중 neochlorogenic acid가 가장 많았다는 Lee 등(2016)의 연구와 일치하였다. 익는 과정 중 오디의 chlorogenic acid 함량이 감소한다는 결과는 기존의 연구(Oki 등, 2006; Lee 등, 2016; Yang 등, 2016)와 일치하였다.

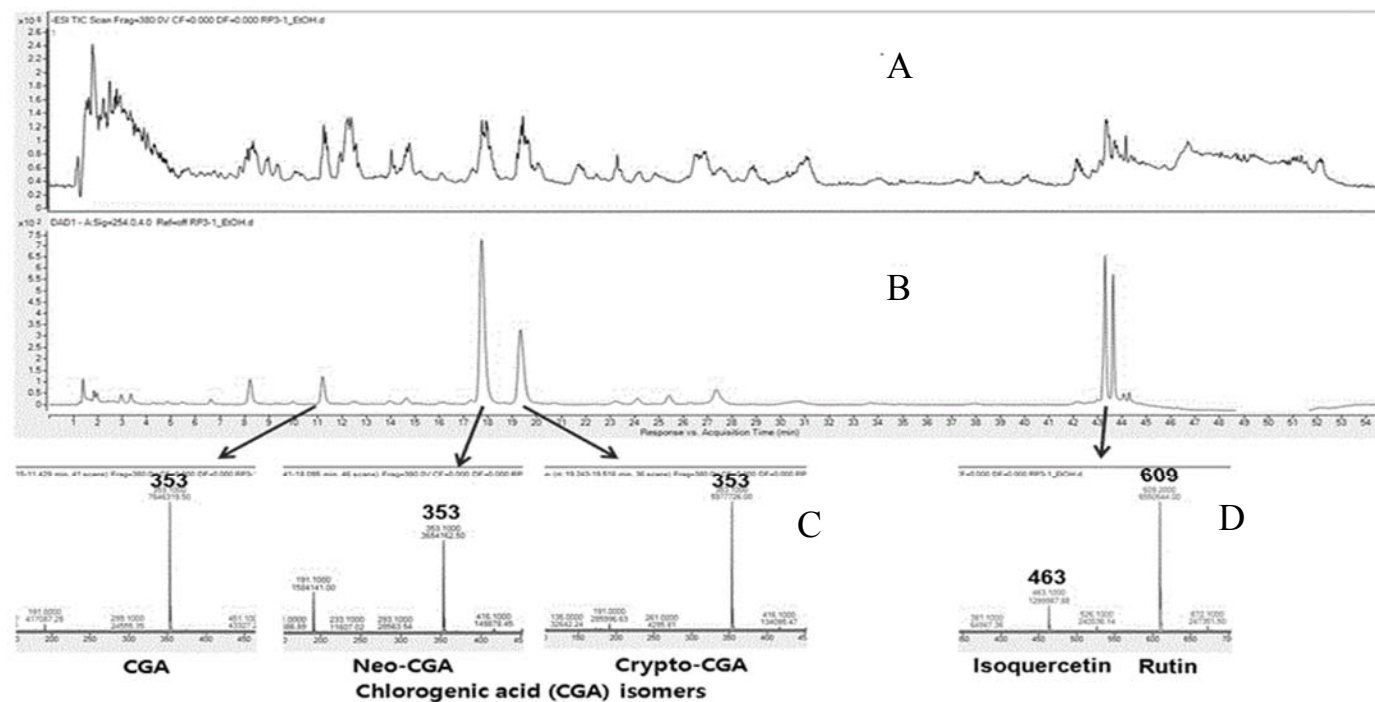


Figure 13. HPLC-DAD-MS analysis of chlorogenic acids and quercetins in mulberry total extract (maturity stage-3). A, total ion chromatogram (scan range, m/z 100-700); B, UV chromatogram at 254 nm; C, mass spectrum (m/z) of chlorogenic acids; D, mass spectrum (m/z) of rutin and isoquercetin.

Table 18. Changes in LC-MS/MS data of phenolic acids in mulberry total extract (MTE) during ripening (mg/100 g MTE)

	Chlorogenic acid	Neo-chlorogenic acid	Crypto-chlorogenic acid	Total chlorogenic acid	Caffeic acid	Protocatechuic acid	4-Hydroxy-benzoic acid	Ferulic acid
MS-1	911.4 a	1443.4 a	1012.1 a	3366.9 a	1.4 a	0.5 d	0.7 a	0.1 a
MS-2	806.8 b	1364.7 a	852.8 b	3024.2 b	0.6 b	0.5 d	0.6 b	0.1 b
MS-3	529.2 c	1068.1 b	581.4 c	2178.6 c	0.3 c	0.5 d	0.6 c	0.1 c
MS-4	307.3 d	649.4 c	323.1 d	1279.8 d	0.1 d	0.9 c	0.3 d	nd
MS-5	218.6 e	484.4 d	200.2 e	903.2 e	nd	1.0 c	0.3 e	nd
MS-6	37.3 f	109.7 e	21.4 f	168.4 f	nd	1.8 b	0.1 f	nd
MS-7	46.5 f	119.4 e	25.0 f	190.9 f	0.1 d	2.2 a	0.1 f	0.1 d

MS, maturity stage; nd, not detected. Neochlorogenic and cryptochlorogenic acids are expressed as chlorogenic acid equivalent. Values are means (n=2).

Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Duncan's test at $P<0.05$.

Table 19. Changes in LC-MS/MS data of phenolic acids in mulberry nonanthocyanin fraction (MNAF) during ripening (mg/100 g MNAF)

	Chlorogenic acid	Neo-chlorogenic acid	Crypto-chlorogenic acid	Total chlorogenic acid	Caffeic acid	Protocatechuic acid	4-Hydroxy-benzoic acid	Ferulic acid
MS-1	2917.1 a	7669.2 a	2226.6 a	12812.9 a	22.3 a	14.0 b	2.4 b	1.8 b
MS-2	2456.0 a	6672.6 a	2013.0 a	11141.6 a	17.3 a	14.0 b	2.2 b	1.7 b
MS-3	1284.0 b	3780.3 b	732.2 b	5796.5 b	8.0 b	11.1 b	1.4 b	1.0 d
MS-4	1210.5 b	4179.5 b	1010.0 b	6400.0 b	9.5 b	17.7 b	1.7 b	1.0 cd
MS-5	859.2 b	3542.7 b	657.9 b	5059.8 bc	5.8 b	21.9 b	1.4 b	1.1 cd
MS-6	251.0 c	1650.5 c	264.4 b	3008.7 cd	7.8 b	78.5 a	5.0 a	2.2 b
MS-7	254.2 c	1785.3 c	212.0 b	2251.5 d	8.2 b	57.4 a	3.4 ab	3.7 a

MS, maturity stage. Neochlorogenic and cryptochlorogenic acids are expressed as chlorogenic acid equivalent. Values are means (n=2). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Duncan's test at $P<0.05$.

Chlorogenic acid를 제외한 나머지 phenolic acid로 caffeic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid는 MTE에 2 mg/100 g, MNAF에 23 mg/100 g 미만으로 미량이었고, 오디가 익어감에 따라 caffeic acid는 감소하고 protocatechuic acid와 ferulic acid는 다소 증가하는 경향은 Yang 등(2016)의 연구와 유사하였다.

Flavonol 4종과 scopoletin을 분석한 총 이온 크로마토그램을 보면(Figure 14), MTE와 MNAF에서 scopoletin, taxifolin, rutin, isoquercetin, morin이 순서대로 분리가 되었으며, quercetin 유도체가 높은 비율로 검출되었다. 앞서 제2장의 HPLC 이용한 분말 오디의 개별 페놀화합물 분석에서 rutin만 검출된 반면, LC-MS/MS를 이용한 이온 선택적인 분석을 통해 rutin과 isoquercetin을 분리하여 검출할 수 있었다. Morin의 경우 표준물질의 머무름 시간과 약간 차이가 있는 피크가 관찰되었는데, 이 성분도 morin과 같은 MRM transition인 m/z 301(precursor 이온)/150.9와 148.9(product 이온)로 나타났다. HPLC-DAD-MS로 분석한 결과(Figure 15), 이 성분 또한 m/z 301로 morin과 질량 스펙트럼이 일치하였으며, 자외선 흡수 스펙트럼에서도 최대흡수파장대가 350-360 nm인 morin과 거의 일치하는 흡수 패턴을 보였으므로 morin 혹은 morin 유사체라 간주하고 정량분석을 하였다. 기존에 보고된 연구에 의하면, 6개 품종 오디에 morin이 0.6-1.6 mg/100 g (db) 함유되어 있으며(Lee 등, 2004), Yang 등(2010)은 오디에 15.7 mg/100 g이 검출되었다고 하였다.

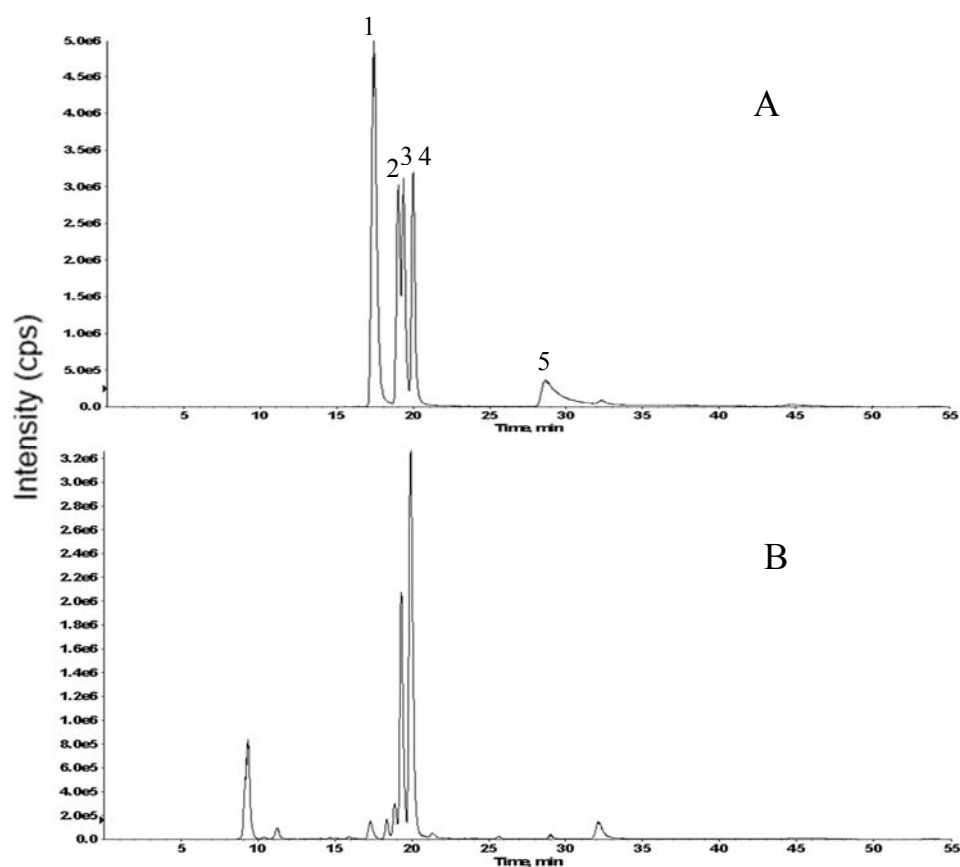


Figure 14. Total ion chromatograms of flavonols and scopoletin standards (A) and mulberry nonanthocyanin fraction (maturity stage-3) (B). 1, scopoletin; 2, taxifolin; 3, rutin; 4, isoquercetin; 5, morin.

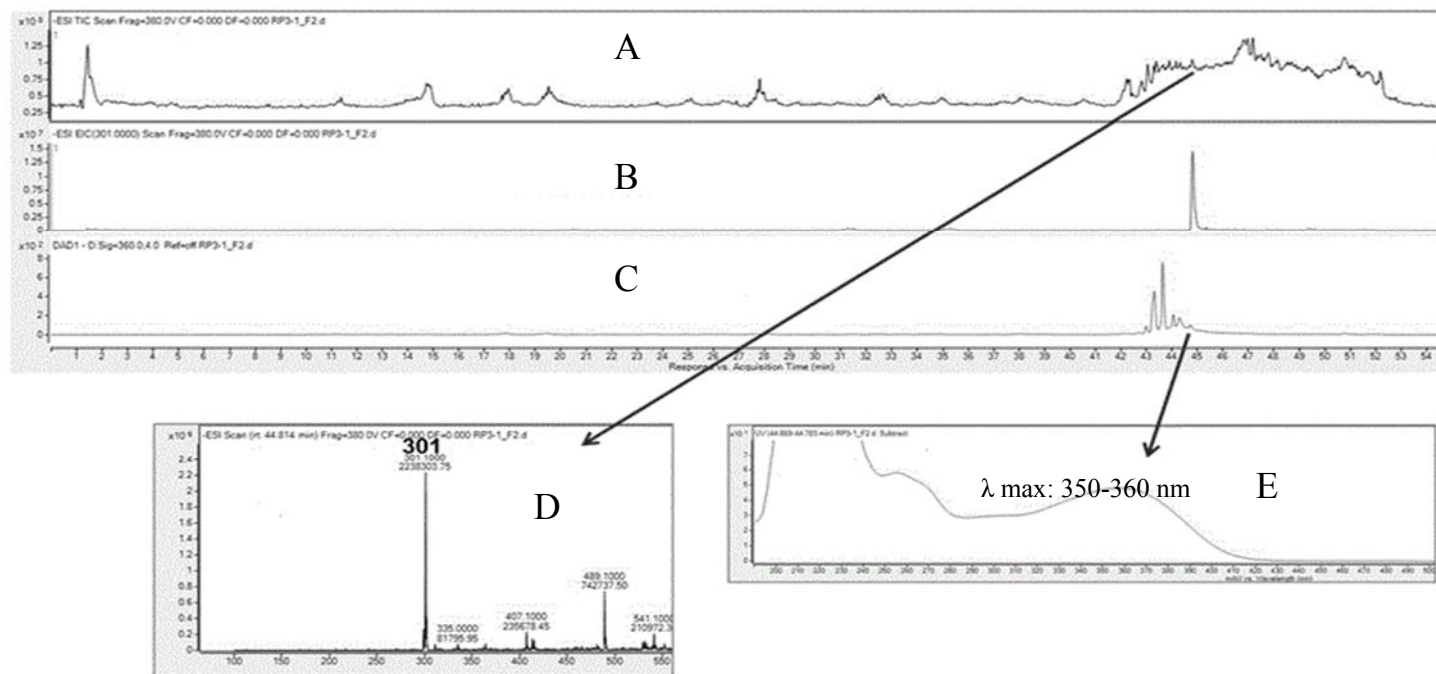


Figure 15. HPLC-DAD-MS analysis of morin in nonanthocyanin fraction (maturity stage-3). A, total ion chromatogram (scan range, m/z 100-700); B, extracted ion chromatogram (scan at m/z 301); C, UV chromatogram at 360 nm; D, mass spectrum (m/z) of morin; and E, UV spectrum of morin (scan range, 200-600 nm).

Table 20과 21을 보면, morin이 MTE에는 1.9–4.0 mg/100 g의 범위로 검출되었고, 그에 반해 MNAF에는 171.5–320.4 mg/100 g으로 상당히 많은 양이 검출되었다.

오디에 주로 함유된 flavonol은 rutin과 isoquercetin으로, MTE에는 각각 202.5–72.5 mg/100 g과 38.2–7.6 mg/100 g, MNAF에는 693.1–401.1과 622.8–160.6 mg/100 g이 함유되어 있었는데, 오디가 익어감에 따라 감소하는 경향을 보였다. 반면 taxifolin은 MTE에 0.8–2.1 mg/100 g, MNAF에 14.2–36.4의 범위로 함유되어 있었고, 익어감에 따라 증가하는 경향이였다. Coumarin 유도체의 하나인 scopoletin은 MFE에 0.4–0.0, MNAF에 13.1–3.8 mg/100 g의 범위로 함유되어 있었으며, 오디가 익는 과정 동안 감소하였다. 오디의 주된 flavonol은 rutin (Zhang 등, 2008; Yang 등, 2010; Lin과 Lay, 2013)과 isoquercetin이며, isoquercetin보다 rutin이 더 많이 함유되어 있다는 결과는 기존 연구(Pawloska 등, 2008; Yang 등, 2016)와 유사하였다. Zhang 등(2008)은 2종의 오디에 taxifolin이 각각 0.7와 3.1 mg/100 (wb)으로, Yang 등(2016)은 4단계로 오디가 익어감에 따라 taxifolin이 0.01–0.04 mg/100 g의 범위로 약간 증가한다고 하였으며, Lin과 Lay(2013)는 3단계의 성숙도에 따른 오디의 scopoletin 함량이 22.1에서 5.3 mg/100 g (db)까지 감소하였다고 보고하였다. 오디의 품종, 환경에 따라 함량의 차이는 있지만, 이러한 기존의 보고들은 본 연구결과와 유사한 경향이였다.

Table 20. Changes in LC-MS/MS data of flavonols and scopoletin in mulberry total extract (MTE) during ripening (mg/100 g MTE)

	Rutin	Isoquercetin	Morin	Taxifolin	Scopoletin
MS-1	202.5 a	38.2 a	3.4	0.8 bc	0.4 a
MS-2	188.3 ab	36.1 a	3.2	0.9 bc	0.4 b
MS-3	153.7 bc	28.4 b	2.6	1.6 a	0.4 b
MS-4	124.0 cd	19.2 c	2.2	0.8 bc	0.2 c
MS-5	104.9 de	14.8 c	1.9	1.2 ab	0.1 d
MS-6	75.9 ef	7.4 d	2.7	2.0 a	0.1 e
MS-7	72.5 f	7.6 d	4.0	2.1 c	nd

MS, maturity stage; nd, not detected. Values are means (n=2). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Duncan's test at P<0.05.

Table 21. Changes in LC-MS/MS data of flavonols and scopoletin in mulberry nonanthocyanin fraction (MNAF) during ripening (mg/100 g MNAF)

	Rutin	Isoquercetin	Morin	Taxifolin	Scopoletin
MS-1	693.1 a	622.8 a	320.4	14.2 ab	13.1 a
MS-2	594.9 ab	533.3 ab	273.7	13.1 b	10.4 ab
MS-3	342.3 c	275.8 bc	171.5	13.8 ab	7.8 abc
MS-4	491.2 bc	390.8 abc	253.0	27.9 ab	4.3 c
MS-5	483.9 bc	326.4 bc	237.9	36.5 ab	5.9 bc
MS-6	455.7 bc	235.2 c	263.6	44.0 a	4.8 bc
MS-7	401.1 c	162.6 c	181.1	36.4 ab	3.8 c

MS, maturity stage. Values are means (n=2). Values with different lower case letters within the same columns are significantly different by Duncan's test at P<0.05.

Bassoli 등(2008)은 0.5–1.0 mM 농도의 chlorogenic acid가 쥐 간 microsome에서 포도당-6-phosphatase 활성을 40%까지, 그리고 쥐 소장에서 분리한 미세융모막 vesicle의 포도당 수송 능력을 80%까지 저해하였다고 보고하였다. 또한 chlorogenic acid와 rutin은 오디의 아세트산에틸 분획물에 풍부하였고(Zhang 등, 2008), 특히 아세트산에틸 분획물이 다른 분획물(에탄올 추출물, 헥세인, 클로로폼, 뷰탄올, 물 분획물)에 비해 α -glucosidase와 DPPH 자유라디칼 제거활성능력이 높았으며, streptozotocin으로 유도된 비만 쥐에서 공복 혈당과 당화 혈청단백질을 유의적으로 감소시키고 산화방지 효소 활성을 증가시켰다(Wang 등, 2013). IAPP의 형성과 응집은 췌장 베타세포의 사멸을 초래하여 type 2 당뇨병의 증상을 악화시키는데(Clark 등, 1987), 32 μ M(10.2 mg/mL) 농도의 morin hydrate가 IAPP 섬유 분해에 효과를 보였다(Noor 등, 2011). 따라서 MNAF에 풍부한 chlorogenic acid, rutin, isoquercetin, morin이 생리 활성을 향상시키는데 기여할 가능성이 크다.

3. 4. 결론

오디의 주요 지방산은 linoleic acid로 80%를 차지하였고 익는 과정 동안 지방산 조성에는 큰 차이가 없었다. δ -토코페롤 함량은 미숙 오디(MS-1, 2)보다 완숙 오디(MS-7)가 유의적으로

($P < 0.05$) 낮았다. 오디에 함유된 cyanide는 섭취 시 안전한 수준이라고 판단하였고, 총 추출물, nonanthocyanin 분획물, anthocyanin 분획물은 Raw264.7과 HepG2 세포 생존율에 큰 영향을 주지 않았다. 총 추출물, nonanthocyanin 분획물, anthocyanin 분획물은 Raw264.7 세포의 산화질소(II) 생성을 억제하였고, 특히 nonanthocyanin 분획물은 HepG2 세포의 hexokinase 활성을 증가시키고 α -glucosidase를 억제하여 혈당강하 효과를 나타낼 가능성이 있다. 오디 추출물의 nonanthocyanin 화합물에 함유된 chlorogenic acid, rutin, isoquercetin, morin이 생리 활성에 기여하는 주요 페놀 화합물이라고 추정한다.

제 4 장

요약과 결론

4. 1. 요약

오디는 다양한 파이토케미컬을 함유하여 생리 활성에 효과가 있다고 알려져 있다. 하지만 오디는 과육이 연하고 과즙이 쉽게 손실되어 유통과 저장에 어려움이 있다는 단점이 있으므로, 오디의 기능성에 대한 다각적인 검토와 잠재적 활용가치를 높이기 위하여 성숙도에 따른 오디의 이화학 특성과 생리 활성을 조사하였다. 본 실험에 사용한 오디는 개화 후 약 4주 경과된 오디(MS-0)를 최초 과일로 간주하고, 이후 7단계(MS-1-7)에 걸쳐 성숙도에 따라 오디의 색과 크기를 고려하여 채집하였다. 채집 즉시 과일은 수분, 무게, 크기, 색도, 경도 분석에 사용하였고, 고형물, pH, 산도는 오디즙을 사용하였으며, 나머지 모든 분석은 냉동 건조 분말 오디를 사용하여 분석하였다.

성숙도에 따른 오디의 이화학 특성에 대한 결과는 다음과 같다.

오디 과피의 색도는 오디가 익어갈수록 명도는 43.2(MS-1)에서 16.9(MS-7)로 감소하였고, 황색도 또한 24.0(MS-1)에서 0.5(MS-7)로 감소하였다. 크기는 증가하였고, 무게는 오디 1개당 약 0.58 g(MS-1)에서 3.39 g(MS-7)으로 증가하였다. 오디의 고형물 함량과 pH는 익는 과정 동안 증가하는 경향이었고(고형물, 5.6-13.7브릭스; pH, 3.5-5.5), 산도는 2.4에서 0.3 g/100 mL로 감소하였으며, 수분 함량(84.4-89.7 g/100 g (wb))은 큰 차이를 보이지 않았다. 오디의 경도는 익어감에 따라 12.7에서 1.1 kg_f으로

급격히 감소하였는데, 특히 중후반기(MS-5) 이후 급격한 변화를 보였다. 냉동 건조 오디의 이화학 성분을 조사한 결과로, 성숙도가 증가할수록 조회분(8.3-4.3 g/100 g (db)), 조단백질(18.1-5.8 g/100 g), 조섬유(41.0-12.7 g/100 g)는 유의적으로($P<0.05$) 감소한 반면, 조지방은 중반(MS-3)까지 10.5에서 18.0 g/100 g로 증가하다가, 그 이후 다시 감소하였다(8.3 g/100 g). 유리당 함량은 익는 과정 동안 유의적으로($P<0.05$) 증가하였고(2.4-26.6 g/100 g), 완숙 시기(MS-6, 7)에는 미숙 시기(MS-1, 2)보다 유리당이 10배 가까이 높았다. Ascorbic acid 함량은 11.3-44.5 mg/100 g의 범위였는데, 특히 MS-5에 그 함량이 가장 높았으며, MS-6에 가장 낮았다. 총 무기질 함량은 3.1-1.5 g/100 g으로 오디가 익어 갈수록 유의적으로($P<0.05$) 감소하였고, 포타슘, 칼슘, 마그네슘이 주요 무기질이었으며, 소듐, 철, 망가니즈, 아연, 구리가 미량으로 함유되어 있었다. 미숙 오디(MS-1, 2; 113.2, 59.6 mg/100 g)의 GABA 함량이 나머지 시기의 오디(MS-3-6, 17.1-33.6 mg/100 g)보다 유의적으로($P<0.05$) 높았다. 오디가 익어감에 따라 총 아미노산은 15.9에서 5.2 g/100 g으로 유의적으로($P<0.05$) 감소하였다. 오디 추출물의 proanthocyanidin 함량은 MS-2-4(20.2-35.3 mg/100 g)에서 유의적으로($P<0.05$) 높았고, 미숙 오디에 비해 완숙 오디(MS-6, 7; 4.1, 8.9 mg/100 g)에는 낮은 경향을 보였다. 오디에 함유되어 있는 총 polyphenol은 1.1-3.2 g/100 g의 범위로 MS-5 이후 급격히 증가하였고, 총 anthocyanin 또한 0.0-2.0 g/100 g의 범위로 MS-4 이후 급격히 증가하였다. 총 flavonoid는

0.1–0.4 g/100 g의 범위로 중반까지 감소하다가 MS-4 이후 증가하였다. HPLC를 이용하여 개별 페놀 화합물을 분석한 결과, 오디가 익어감에 따라 phenolic acid와 rutin은 감소하는 경향이었고, anthocyanin은 증가하였다. 오디의 주요 anthocyanin은 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside였다. Chlorogenic acid 함량은 3.92에서 0.58 mg/100 g으로 유의적으로($P<0.05$) 감소하였다. 오디의 DPPH와 ABTS 자유라디칼 제거활성은 각각 0.16–0.66 mmol/100 g과 0.39–1.92 mmol/100 g의 범위로 익는 과정 동안 증가하였고, 특히 마지막 완숙기에 급격하게 증가하였다.

성숙도에 따른 오디 추출물의 *in vitro* 생리 활성과 기능 성분 분석 결과는 다음과 같다.

미숙 오디(MS-1-5)의 cyanide 함량은 4.1–7.7 mg/100 g (db)였고, 완숙 오디(MS-6, 7)에서는 검출되지 않았다. 오디의 주요 지방산은 linoleic acid로 80%를 차지하였고, palmitic acid (8.0–11.0%), oleic acid (4.5–6.0%), stearic acid (3.5–3.9%), eicosenoic acid (1.0–2.3%) 순서로 많았으며, 익는 과정 동안 지방산 조성에는 큰 차이가 없었다. δ -토코페롤 함량은 미숙 오디(MS-1, 2; 116.9, 126.6 mg/100 g lipid)보다 완숙 오디(MS-7; 93.5 mg/100 g)에 유의적으로($P<0.05$) 낮았고, γ -토코페롤은 유의적인 차이가 없었다. 오디 건조 분말 시료 당 총 토코페롤 함량은 지방 함량이 높은 MS-3, 4, 5(27.3–29.2 mg/100 g (db))에서 나머지 시기의 오디(13.1–20.7 mg/100 g)보다 높았다. 익는 과정 중

오디 총 추출물(MTE), nonanthocyanin 분획물(MNAF), anthocyanin 분획물(MAF)은 모두 50–400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 Raw264.7과 HepG2 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았다. MTE를 50–400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 Raw264.7 세포에 처리한 결과, 산화질소(II) 생성율은 MS-3과 5를 제외한 나머지 성숙 시기 시료의 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서부터 억제되었으나, 농도의존적 경향과 성숙도에 따른 차이는 보이지 않았다. MNAF는 MS-2와 6을 제외하고 80 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 산화질소(II) 생성이 억제되었고, 농도의존적인 경향이 나타났다. MAF를 50–200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 결과, MS-4와 5는 모든 농도에서 대조군 대비 산화질소(II) 생성이 억제되었으나, MS-6은 50과 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도만 억제 효과가 있었고, MS-7의 경우는 모든 농도에서 대조군과 차이가 없었다. Hexokinase 활성은 대조군에 비해 MS-5의 MNAF가 유의적으로 ($P<0.05$) 높았으며, MAF-4-7은 다소 낮은 활성을 보였다. Hexokinase 활성은 완숙 오디의 MNAF(MS-6, 7; 96.9, 98%)보다 미숙 오디의 MNAF(MS-1-5; 101.9–114.8%)가 높았으며, MAF(MS-4-7; 86.0–99.2)보다 높은 경향이였다. 오디가 익어갈수록 MNAF의 α -glucosidase 억제능은 낮아졌고, MAF의 경우는 높아졌다. 특히, 아카보스와 비교하였을 때, 완숙 오디(MS-6, 7)의 MNAF와 미숙 오디(MS-4, 5)의 MAF를 제외하고 아카보스보다 α -glucosidase 억제능이 유의적으로 ($P<0.05$) 우수하였다.

오디 총 추출물의 1-deoxynojirimycin 함량은 미숙 오디(MS-1-5, 5.1–9.0 mg/100 g)가 완숙 오디(MS-6, 7, 1.7–1.9

mg/100 g)보다 2배 이상 높았다. LC-MS/MS 분석으로 페놀 화합물을 확인하고 정량한 결과, MTE와 MNAF에 함유된 phenolic acid는 chlorogenic acid가 대부분이었으며, 각각 3,367-191 mg/100 g과 12,813-2,251 mg/100 g이 함유되어 있었으며 오디가 익어감에 따라 급격히 낮아졌다. Chlorogenic acid 중 neochlorogenic acid가 가장 많았으며, chlorogenic acid를 제외한 나머지 phenolic acid로 caffeic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid는 MTE에 2 mg/100 g, MNAF에 23 mg/100 g 미만으로 미량 함유되어 있었고, 오디가 익어감에 따라 caffeic acid는 감소하였고, protocatechuic acid와 ferulic acid는 다소 증가하는 경향이었다. 앞서 HPLC-DAD를 이용하여 분석한 분말 오디에 함유된 quercetin은 rutin뿐이었는데, LC-MS/MS를 이용한 이온 선택적인 분석을 통해 rutin과 isoquercetin을 분리하여 검출할 수 있었다. 오디에 주로 함유된 flavonol은 rutin과 isoquercetin으로, MTE에는 각각 202.5-72.5 mg/100 g과 38.2-7.6 mg/100 g, MNAF에는 693.1-401.1과 622.8-160.6 mg/100 g 함유되어 있었으며 익어갈수록 감소하였다. Morin은 MTE에 1.9-4.0 mg/100 g의 범위로 함유되어 있었고, MNAF에는 171.5-320.4 mg/100 g으로 상당히 많은 양이 함유되어 있었다. Taxifolin은 MTE에 0.8-2.1 mg/100 g, MNAF에 14.2-36.4 mg/100 g의 범위로 함유되어 있었고, 오디가 익어감에 따라 증가하는 경향이었다. Scopoletin은 MFE에 0.4-0.0 mg/100 g, MNAF에 13.1-3.8 mg/100 g의 범위로 함유되어 있었으며, 익는 과정 동안

감소하였다.

4. 2. 결론

본 연구에서는 기능성 식품으로서 오디의 잠재적인 활용 가능성을 탐색하고자, 7단계 성숙도에 따른 오디의 이화학 특성을 조사하고, 오디 추출물의 생리 활성과 기능 성분에 대하여 조사하였다. 성숙도가 증가할수록, 오디의 이화학 특성은 후반기에 극적으로 변화하였다. 완숙 오디는 미숙 오디에 비해 총 polyphenol과 anthocyanin이 많아 산화방지 활성이 높았으며, 미숙 오디는 저장성 측면에서 pH는 낮고 산도가 높았고, 영양학적 측면에서는 조단백질, 조지방, 조섬유, 무기질이 많았으며, 기능성 측면에서는 GABA, 아미노산, 토코페롤, phenolic acid, flavonol 함량이 높았다. 오디 총 추출물과 nonanthocyanin 분획물, anthocyanin 분획물은 Raw264.7과 HepG2 세포 생존율에 큰 영향을 주지 않았고, Raw264.7 세포의 산화질소(II) 생성을 억제하여 염증 억제 효과가 있었으며, 특히 nonanthocyanin 분획물은 HepG2 세포의 hexokinase 활성을 증가시키고 α -glucosidase를 억제하여 혈당강하 효과를 나타낼 가능성이 있다. 오디 추출물의 nonanthocyanin 화합물에 함유된 chlorogenic acid, rutin, isoquercetin, morin이 생리 활성에 기여하는 주요 페놀 화합물이라고 추정한다. 따라서, 완숙 오디와 더불어 미숙 오디는 기능성 식품 소재로서 잠재적인 활용 가능성이 있다고 본다.

참고문헌

- 박미영. (2013). Black raspberry씨와 포도씨 탄닌 분획물의 항산화 및 항염증 효과. 석사학위논문, 서울대학교 출판사, 서울, 대한민국, pp. 28.
- 식품의약품안전청. (2009). 한약재 감별도감. 호미출판사, 서울, 대한민국, pp. 226.
- 식품의약품안전처. (2016). 유해물질 간편 정보지 7: 시안화합물. 식품의약품안전처, 청주, 대한민국, pp. 6
- 정하나. (2015). 나무딸기 과일의 항산화·항염증 효과. 박사학위논문, 서울대학교 출판사, 서울, 대한민국.
- 허준(동의문헌연구실편역). (2005). 신편•대역 동의보감. 법인문화사, 서울, 대한민국, pp. 3584.
- AACC. (1995). Approved methods of the AACC (9thed.). St. Paul, MN, USA: American association of cereal chemists.
- Abcam. (2015). Hexokinase assay kit (colorimetric): instruction for use. Abcam, UK
- American Diabetes Association. (2001). Post blood glucose. *Diabetes Care*, 24, 775-778.

- AOAC International. (2005). Official Methods of Analysis (18th ed.). Association of Official Analytical Chemist. Gaithersburg, MD, USA
- Arvouet-Grand, A., Vennet. B., Pourrant, A, & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal De Pharmacie De Belgique*, 49, 462-468.
- Bae, S, H., & Suh, H. J. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 955-962.
- Bassoli, B.K., Cassolla, P., Borda-Murad, G. R., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria C. L., Bazotte, R. B., Silva, R. S. S. F., & Souza, H. M. (2008). Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function*, 26, 320-328.
- Bastyr, E. J., Stuart, C. A., Brodows, R. G., Schwartz, S., Graf, C. J., Zagar, A., & Robertson, K. E. (2000). Therapy focused on lowering postprandial glucose, not fasting glucose, may be superior for lowering. *Diabetes Care*, 23, 1236-1241.
- Benalla, W., Bellahcen, S., & Bnouham, M. (2010). Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current Diabetes Reviews*, 6, 247-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Brady, C. J. (1987). Fruit ripening. *Annual Review Plant Physiology*, 38, 155-

- Caro, J. F., Triester, S., Patel, V. K., Tapscott, E. B., Frazier, N. L., & Dohm, G. L. (1995). Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes. *Hormone Metabolism Research*, 27, 19-22.
- Cesar, G. F. (2009). Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA
- Cha, H. S., Youn, A. R., Park, P. J., Choi, H. R., & Kim, B. S. (2007). Physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel during maturation. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 39, 476-479.
- Chen, P. N., Chu, S. C., Chiou, H. L., Kuo, W. H., Chiang, C. L., & Hsieh, Y. S. (2006). Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*, 235, 248-259.
- Clark, A., Lewis, C. E., Willis, A. C., Cooper G. J. S., Morris, J. F., Reid, K. B. M., & Turner R. C. (1987). Islet amyloid formed from diabetes-associated peptide may be pathogenic in type-2 diabetes. *The Lancet*, 2, 231-234.
- Crozier, A., Ashihara, H., & Clifford, M. N. (Eds). (2006). Plant Secondary Metabolites and the Human Diet. Blackwell Publishing, Oxford, England.
- Cuevas-Rodriguez, E. O., Dia, V. P., Yousef, G. G., Garcia-Saucedo, P. A., Lopez-Medina, J., Paredes-Lopez, O., Demejia, E. G., & Lila, M. A. (2010). Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus spp.*) extracts. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 58, 9542-9548.

Ercisli, S., & Orhan, E. (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103, 1380-1384.

Gang, D. R. The biological activity of phytochemicals: Chapter 3. Fractionation of grape seed proanthocyanidins for bioactivity assessment. Springer, 41. pp. 33.

George, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370-1373.

Gould, K. (2004). Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 314-320.

Gu, Y., Hurst, W. J., Stuart, D. A., & Lambert, J. D. (2011). Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5305-5311.

Haffner, S. M., & Miettinen, H. (1997). Insulin resistance implications for type II diabetes mellitus and coronary heart disease. *The American Journal of Medicine*. 103, 152-162.

Hayakawa, K., Kimura, M., Kasawa, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Yamori, Y. (2004). Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Nutrition*, 92, 411-417.

- Heim, K., Tagliaferro, A., & Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Iynedjian, P. B., Mobius, G., Seitz, H. J., Wollheim, C. B., & Renold, A. E. (1986). Tissue-specific expression of glucokinase: Identification of the gene product in liver and pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 1998-2001.
- Izumi, S., Ohno, N., & Yadomae, T. (1997). Down-regulation of LPS-induced nitric oxide synthesis of murine macrophages by oral administration of Sho-saiko-to. *Drug Development Research*, 40, 48-55.
- Kadowaki, H., Patton, G. M., & Robins, S. J. (1993). Effect of phosphatidylcholine molecular species on the uptake of HDL triglycerides and cholesteryl esters by the liver. *Journal of Lipid Research*, 34, 180-189.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4360-4367.
- Kao, Y., Chang, H., Lee, M., & Chen, C. (2006). Tea, obesity, and diabetes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 188-210.
- Kapustka, L. A., Annala, A. E., & Swanson, W. C. (1981). The peroxidase-glucose oxidase system: A new method to determine glucose liberated by carbohydrate degradino soil enzymes. *Plant Soil*, 63, 487-490.
- Kim, E. O., Lee, Y. J., Leem, H. H., Seo I. H., Yu M. H., Kang D. H., & Choi,

- S. W. 2010). Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberries from seven different *Morus alba* L. cultivars. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39, 1467-1475.
- Kim, H. B., Kim, A. J., & Kim, S. Y. (2003). The analysis of functional materials in mulberry fruit and food product development trends. *Food Science and Industry*, 36, 49-60.
- Kim, H. B., Kim, S. L., & Kang, S. W. (2004). Varietal analysis and quantification of amino acid in mulberry fruits. *Korean Journal of Sericultural Science*, 46, 47-53.
- Kim, J. M., & Shin, M. (2011). Characteristics of *Rubus coreanus* Miq. fruits at different ripening stages. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 43, 341-347.
- Kim, S. B., Chang, B. Y., Jo, Y. H., Lee, S. H., Han, S. B., Hwang, B. Y., Kim, S. Y., & Lee, M. K. (2013). Macrophage activating activity of pyrrole alkaloids from *Morus alba* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 145, 393-396.
- Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S., & Miyazawa, T. (2007). Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5869-5874.
- Kirpichnikov, D., McFarlane, S. I., & Sowers, J. R. (2002). Metformin: an update. *Annals Internal Medicine*, 137, 25-33.

- Kong, W. H., Oh, S. H., Ahn, Y. R., Kim, K. W., Kim, J. H., & Seo, S. W. (2008). Antiobesity effects and improvement of insulin sensitivity by 1-deoxynojirimycin in animal models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2613-2619.
- Korea Food and Drug Administration (KFDA). (2012). National standard of traditional medicinal (herbal and botanical) materials. 4th ed.; KFDA; Cheongju, Korea, Available from <http://www.mfds.go.kr>
- Kurth-Kraczek, E. J., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., & Winder, W. W. (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, 48, 1667-1671.
- Law, M. R., & Morris, J. K. (1998). By how much does fruit and vegetable consumption reduce the risk of ischaemic heart disease? *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, 549-556.
- Lee, H. H., Moon, Y. S., Yun, H. K., Park, P. J., & Kwak, E. J. (2014). Contents of bioactive constituents and antioxidant activities of cultivated and wild raspberries. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 32, 115-122.
- Lee, H. I., & Lee, M. K. (2015). Effects of scopoletin supplementation on insulin resistance and antioxidant defense system in chronic alcohol-fed rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44, 173-181.
- Lee, H. W., Shin, D. H., & Lee, W. C. (1998). Morphological and chemical characteristics of mulberry (*Morus*) fruit with varieties. *Korean Journal of Sericultural Science*, 40, 1-7.

- Lee, J. Y., Moon, S. O., Kwon, Y. J., Rhee, S. J., Park, H. R., & Choi, S. W. (2004). Identification and quantification of anthocyanins and flavonoids in mulberry (*Morus* sp.) cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 13, 176-184.
- Lee, K. M., Oh, T. J., Kim, S. H., Kim, H. Y., Chung, H., Min, D. S., Auh, J. H., Lee, H. J., Lee, J., & Choi, H. K. (2016). Comprehensive metabolic profiles of mulberry fruit (*Morus alba* L.) according to maturation stage. *Food Science and Biotechnology*, 25, 1035-1041.
- Lee, Y. C., Lee, J. H., Kim, S. D., Chang, M. S., Jo, I. S., Kim, S. J., Hwang, K. T., Jo, H. B., & Kim, J. H. (2015). Chemical composition, functional constituents, and antioxidant activities of berry fruits produced in Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44, 1295-1303.
- Lin, C. Y. & Lay, H. L. (2013). Characteristics of fruit growth, component analysis and antioxidant activity of mulberry (*Morus* spp.). *Scientia Horticulturae*, 162, 285-292.
- Lou, H., Hu, Y., Zhang, L., Sun, P., & Lu, H. (2012). Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruit development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values. *LWT-Food Science and Technology*, 47, 19-24.
- Machii, H., Koyama, A., & Yamanouchi, H. (2000). FAO Electronic Conference: Mulberry for animal production, Available from <http://www.fao.org/livestock/agap/frg/mulberry>

- Marks, S. C., Mullen, W., & Crozier, A. (2007). Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 719-728.
- Matchinsky, F. M., & Ellerman, J. E. (1968). Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *Journal of Biological Chemistry*, 243, 2730.
- Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA). (2016). Agriculture, food, and rural affairs statistics year book. MAFRA, Sejong, Korea.
- Mantivani, A., Allavena, P., Sica, A., & Blackwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-444.
- McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2008). Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors*, 34, 73-80.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 801457, Hindawi.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525.

- Mullen, W., Boitier, A., Stewart, A. J., & Crozier, A. (2004). Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: Analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1058, 163-168.
- Noor, H., Cao, P., & Raleigh, D. P. (2011). Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers. *Protein Science*, 21, 373-382.
- Nuengchamnong, N., Ingkaninan, K., Kaewruang, W., Wongareonwanakij, S., & Hongthongdaeng, B. (2007). Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 853-88.
- Oh, H. H., Hwang, K. T., Kim, M. Y., Lee, H. K., & Kim, S. Z. (2008). Chemical characteristics of raspberry and blackberry fruits produced in Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37, 738-743.
- Oki, T., Kobayashi, M., Nakamura, T., Okuyama, A., Masuda, M., Shiratsuchi, H., & Suda, I. (2006). Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation. *Journal of Food Science*, 71, C18-C22.
- Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, 85, 1341-1351.

- Park, J. H., Baek, M. R., Lee, B. H., Yon, G. H., Ryu, S. Y., Kim, Y. S., Park, S. U., & Hong, K. S. (2009). α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of compounds from roots extract of *Pueraria thunbergiana*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 17, 357-362.
- Park, J. H., Hong, S. I., Jeong, M. C., & Kim, D. M. (2013). Quality characteristics and changes in mulberry (*Morus alba* L.) depending on their maturity during distribution. *The Korean Society of Food Preservation*, 20, 304-316.
- Park, S. (2007). Strategies for development of anti-diabetic functional foods. *Food Science and Industry*, 40, 46-58.
- Park, Y. S., Kang, S. S., Choi, H. J., Yang, S. J., Shon, H. H., Seo, H. H., & Jeong, J. M. (2014). Effect of mulberry (*Morus alba* L.) extract on blood flow improvement. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43, 498-506.
- Pawlowska, A. M., Oleszek, W., & Braca, A. (2008). Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3377-3380.
- Podsedeck, A., Majewska, I., Redzynia, M., Sosnowska, D., & Koziolkiewicz, M. (2014). *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4610-4617.
- Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M. J., & Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food*

and Agriculture, 90, 1473-1478.

Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40, 1014-1028.

Qian, Z., Wu, Z., Huang L., Qiu, H., Wang, L., Li, L., Yao, L., Kang, K., Qu, J., Wu, Y., Luo, J., Liu, J. J., Yang, Y., Yang, W., & Gou, D. (2015). Mulberry fruit prevents LPS-induced NF- κ B/pERK/MAPK signals in macrophages and suppresses acute colitis and colorectal tumorigenesis in mice. *Scientific Reports*, 5, 17348, 1-13.

Reaven, G. M., Lardinois, C. K., Greenfield, M. S., Schwartz, H. C., & Vreman, H. J. (1990). Effect of acarbose on carbohydrate and lipid metabolism in NIDDM patients poorly controlled by sulfonylureas. *Diabetes Care*, 13 (Suppl 3), 32-36.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Riboli, E., & Norat, T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 559S-569S.

Rodríguez-Sánchez, S., Hernández-Hernández, O., Ruiz-Matute, A. I., & Sanz, M. L. (2011). A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC-MS in

- mulberry (*Morus* sp.). *Food Chemistry*, 126, 353-359.
- Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P., & Souza, G. E. P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2236-2240.
- Schindler, P. W., Below P., Hemmerle, H., Burger, H. J., Swamy K. H. S., Arion W. J., Efendic, S., & Herling A. W. (1998). Identification of two new inhibitors of the hepatic glucose-6-phosphate system. *Drug Development Research*, 44, 34-40.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8021-8030.
- Son, W. R., & Choi, S. W. (2013). Biological activity and analysis of α -glucosidase inhibitor from mulberry (*Morus alba* L.) wine. *The Korean Society of Food Preservation*, 20, 877-885.
- Song, W., Wang, H. J., Bucheli, P., Zhang, P. F., Wei, D. Z., & Lu, Y. H. (2009). Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9133-9140.
- Steinmetz, K. A., & Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96,

- Sun, X., Chen, R., Yang, Z., Sun, G., Wang, M., Ma, X., Yang, L. & Sun, X. (2014). Taxifolin prevents diabetic cardiomyopathy *in vivo* and *in vitro* by inhibition of oxidative stress and cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 221-232.
- Tang, W. & Eisenbrand, G. (2011). *Handbook of Chinese Medicinal Plants*. 1st ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim, Germany, pp. 777-781.
- Viljakainen, S., Visti, A., & Laakso, S. (2002). Concentrations of organic acids and soluble sugars in juices from Nordic berries. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 52, 101-109.
- Wang, Y., Xiang, L., Wang, C., Tang, C., & He, X. (2013). Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PLoS ONE*, 8, e71144 1-10.
- Wang, S. Y., Chen, C. T., & Wang, C. Y. (2009). The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chemistry*, 112, 676-684.
- Weyer, C. Bogardus, C., Mott, D. M., & Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 787-794.
- WHO. (2003). Diet Nutrition and the Prevention of Chronic Disease, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 916. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- Wongsa, P., Chaiwarit, J., & Zamaludien, A. (2012). *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*, 131, 964-971.
- Wu, K. (2003). Nutrition and food hygiene. People's Health Publishing House, Beijing, p. 21.
- Yang, J., Liu, X., Zhang, X., Jin, Q., & Li, J. (2016). Phenolic profiles, antioxidant activities, and neuroprotective properties of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) fruit extracts from different ripening stages. *Journal of Food Science*, 81, C2439-C2446.
- Yang, Z., Wang, Y., Wang, Y., & Zhang Y. (2012). Bioassay-guided screening and isolation of α -glucosidase and tyrosinase inhibitors from leaves of *Morus alba*. *Food Chemistry*, 131, 617-625.
- Yang, X., Yang, L., & Zheng, H. (2010). Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2374-2379.
- Yao, Y., Sang, W., Zhou, M., & Ren, G. (2010). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 770-774.
- Zadernowski, R., Naczek, M., & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118-2124.
- Zhang, W., Han, F., He, J., & Duan, C. (2008). HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis and antioxidant activities of nonanthocyanin phenolics in mulberry (*Morus alba* L.). *Journal of Food Science*, 73, C512-C518.

Abstract

Changes in Physicochemical Characteristics and *in vitro* Biological Activity of Mulberry during Ripening

Yongcheol Lee

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Mulberry fruits contain various substances known to have physiological activities in human health. Mulberry fruits are prone to bruising during storage and distribution because of their perishable characteristics. Thus, it is necessary to study physicochemical characteristics and biological activity of mulberry fruits during ripening in order to enhance their potential utilization. In this study, therefore, we specifically collected mulberry fruits at seven different maturity stages (MS-1-7), and investigated changes in color, firmness, proximate composition, and various chemical constituents including sugars, minerals, amino acids, 1-deoxynojirimycin, phenolic compounds, and antioxidant activity. In addition, *in vitro* biological effects of mulberry fruit

extract on nitric oxide production, hexokinase activity, and α -glucosidase inhibition were determined. The predominant contributors to biological activities were also investigated using LC-ESI-MS/MS.

As the fruits were ripening, lightness and yellowness decreased, and size and weight increased. Firmness rapidly decreased when the fruits fully matured, changing from 12.7 to 1.1 kg_f. Soluble solids (5.6-13.7°Brix fruit juice) and pH (3.5-5.5) tended to increase, while acidity (2.4-0.3 g/100 mL fruit juice), crude ash (8.3-4.3 g/100 g (db)), protein (18.1-5.8 g/100 g), dietary fiber (41.0-12.7 g/100 g), minerals (3.1-1.5 g/100 g), and amino acids (15.9-5.2 g/100 g) decreased during ripening. Free sugars of the fully mature fruits were ten times higher than those of the immature fruits. Content of γ -aminobutyric acid tended to decrease, changing from 113.2 to 17.1 mg/100 g during ripening. Phenolic acids and rutin decreased during ripening, especially over six times more chlorogenic acid in the immature fruits than in the fully mature fruits. Total polyphenols, anthocyanins, and antioxidant activities increased during ripening.

Total cyanide content of immature fruits ranged from 4.1 to 7.7 mg/100 g (db), and it was not detected in mature fruits. The major fatty acid contained in mulberry fruits was linoleic acid (about 80%). There was little difference in fatty acid composition during ripening. δ -Tocopherol in immature fruits (MS-1, 2; 116.9, 126.6 mg/100 g lipid) was significantly higher than in mature fruits (MS-7; 93.5 mg/100 g). Mulberry total extract (MTE), nonanthocyanin fraction (MNAF), and anthocyanin fraction (MAF) at MS-1-7 (50-400 μ g/mL) did not affect Raw264.7 and HepG2 cell viability. MTE, MNAF, and MAF had anti-inflammatory effects by lowering nitric oxide production in Raw264.7 cells. Hexokinase activity in HepG2 cells was

significantly ($P<0.05$) higher in MNAF of MS-5 compared to the control. Hexokinase activity of MAF was slightly lower than that of MNAF. As the fruits ripened, α -glucosidase inhibition of MNAF decreased, while that of MAF increased. In particular, α -glucosidase inhibition of MNAF (MS-1-5) and MAF (MS-6 and 7) was superior to that of acarbose. The content of 1-deoxynojirimycin in the MTE from immature fruits was higher than that of mature fruits. Phenolic compounds contained in MTE and MNAF could be identified and quantified by HPLC-MS/MS. The major phenolic acids contained in the MTE and MNAF were chlorogenic acid, neochlorogenic acid, and cryptochlorogenic acid, which decreased during ripening. Furthermore, the predominant flavonols present in the MTE and MNAF were rutin, isoquercetin, and morin, which also decreased during ripening. As the fruits ripened, taxifolin increased, whereas scopoletin decreased.

In conclusion, as the fruits ripened, physicochemical characteristics of mulberry fruits dramatically changed after the mid-to-late stages. Mature mulberry fruits were rich in anthocyanins, which resulted in higher antioxidant activity compared to immature fruits. Meanwhile, in most respects, immature mulberry fruits had beneficial advantages in terms of functional compounds. The MTE, MNAF, and MAF had anti-inflammatory effects by lowering nitric oxide production in Raw264.7 cells. The MNAF increased hexokinase activity in HepG2 cells and inhibited α -glucosidase, indicating that the MNAF might have an anti-diabetic effect. Chlorogenic acid, rutin, isoquercetin, and morin present in nonanthocyanins might contribute to biological activities of mulberry. Therefore, immature mulberry fruits as well as mature fruits might be potential functional food sources.

Key words: maturity, phenolic compounds, antioxidant activity, α -glucosidase, nonanthocyanin, mulberry

Student number: 2011-30476